



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

TESIS

ANÁLISIS *IN SILICO* DE LAS ISOFORMAS DE LA 11B-HSD; DOCKING Y DINÁMICA MOLECULAR DE SUSTRATOS E INHIBIDORES

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

JORGE RODOLFO BELCHEZ RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ALAN CARRASCO CARBALLO

CODIRECTOR DE TESIS:

DR. JOEL LUIS TERÁN VÁZQUEZ

SEPTIEMBRE 2024





El presente proyecto de tesis se realizó en la División de Bioinformática del Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica, del Centro de Química, del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, bajo la dirección del Dr. Alan Carrasco Carballo y el Dr. Joel Luis Terán Vázquez.

DEDICATORIA

A la familia Belchez-Rodríguez, que siempre han sido fuente de inspiración y ejemplo en mi vida. En particular a mi abuelo Jorge Belchez Landero quien le hubiera encantado estar presente en la culminación de mi etapa universitaria, siempre serás parte de mis logros gracias a tus incontables enseñanzas.

Agradecimientos

Al Dr. Alan Carrasco Carballo por guiarme en la construcción de esta tesis, así como en otros proyectos, por fomentar los valores en el deber científico y el carácter académico y profesional. También agradezco todos los conocimientos compartidos de suma importancia para mi formación como científico.

Agradezco al Dr. Joel Luis Terán Vázquez por su apoyo en la revisión y dirección de este proyecto de tesis, también por compartir su tiempo en la resolución de dudas en química orgánica en este y otros trabajos realizados.

A la comisión revisora integrada por el Dr. Jesús Sandoval Ramíres, Dr. David Miguel Aparicio Solano y el Mtro. Jesús Alberto Rojas Morales por sus comentarios, observaciones y revisiones sobre este trabajo.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Elucidación y Síntesis de Química Orgánica por acompañarme durante el último año de licenciatura.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por formar parte del desarrollo profesional y personal de mi familia durante tres generaciones.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1.0 ANTECEDENTES	2
1.1 Enfermedades de alta prevalencia y mortalidad.	2
1.2 Estructura y función de las HSDHs	3
1.2.1 Mecanismo catalítico de las HSDHs AKR.....	5
1.2.2 Mecanismo catalítico de las HSDHs SDR	6
1.3 Las 11 β Hidroxiesteroide deshidrogenasas	7
1.3.1 Receptores de glucocorticoides (RG) y mineralocorticoides (RM)	7
1.3.2 11 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1	8
1.3.3 11 β Hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2	9
1.4 Inhibidores de las 11 β HSDs	9
1.4.1 Inhibidores de la 11 β HSD1	9
1.4.2 Inhibidores de la 11 β -HSD2	10
1.4.3 Inhibidores no específicos de la 11 β -HSD1 y 11 β -HSD2	13
1.5 Patologías asociadas a glucocorticoides por la acción de las 11 β -HSDs	13
1.5.1 Enfermedades neurodegenerativas	14
1.5.2 Diabetes mellitus tipo 2	15
1.5.3 Síndrome de Cushing	15
1.5.4 Cáncer	15
1.5.5 Exceso aparente de mineralocorticoides.....	16
1.6 Bioinformática de las 11 β -HSD1 y 11 β -HSD2	16
2.0 OBJETIVOS	20
Objetivo general	20
Objetivos particulares	20
3.0 METODOLOGÍA.....	21
3.1 Consulta y selección de cristales.	21
3.2 Alineamiento	21
3.3 Preparación de Proteínas	21
3.4 Preparación de Ligandos	21
3.4 Docking Molecular	22

3.5 Dinámica Molecular	22
4.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	23
4.1 Docking molecular de sustratos e inhibidor de la 11 β -HSD1 con el cristal 3QQP	23
4.2 Docking molecular de sustratos e inhibidor de la 11 β -HSD1 con el cristal 2BEL	30
4.3 Docking molecular de sustrato e inhibidor de la 11 β -HSD2.....	35
4.4 Dinámica molecular de la 11 β -HSD1 cristal 2BEL con el inhibidor no selectivo: carbenoxolona.....	40
4.5 Dinámica molecular de la 11 β -HSD1 cristal 3QQP con el inhibidor no selectivo: carbenoxolona.....	46
4.6 Dinámica molecular de la 11- β HSD2 modelada en Alphafold con el inhibidor no selectivo: carbenoxolona	51
5.0 CONCLUSIONES.....	57
6.0 BIBLIOGRAFÍA	59

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
11 β -HSD1	11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1
11 β -HSD2	11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2
HSDH	Hidroxiesteroide deshidrogenasa
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
AKR	Aldo-ceto reductasa
SDR	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta
GC	Glucocorticoides
RE	Retículo endoplásmico
RG	Receptor de glucocorticoides
RM	Receptor de mineralocorticoides
H6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
HPA	Hipotálamo-pituitaria-adrenal
RMSD	Desviación cuadrática media
RMSF	Fluctuación cuadrática media
SSE	Elementos estructurales secundarios
L-RMSF	Fluctuación cuadrática media del ligando

RESUMEN

Las 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasas de tipo 1 y 2 (11 β -HSD1 y 11 β -HSD2) son enzimas que catalizan la interconversión del cortisol y la cortisona en el cuerpo humano, su función biológica permite el control de los niveles de glucocorticoides a nivel local de manera tejido-específica, sobre todo en tejidos con alta expresión de receptores de mineralocorticoides. Por esta razón, las deficiencias en la función de estas isoenzimas pueden llevar a patologías como diabetes tipo 2, cáncer, el síndrome de exceso de mineralocorticoides aparente, enfermedades neurodegenerativas, síndrome de Cushing y otros síntomas del síndrome metabólico. En este trabajo se estudiaron las interacciones a nivel bioinformático de los sustratos endógenos de ambas enzimas con la finalidad de determinar los residuos clave en el acoplamiento. El Docking Molecular se realizó con los cristales 3QQP y 2BEL de la 11 β -HSD1 para representar sus dos posibles actividades como reductasa y oxidasa, respectivamente. Por otro lado, la 11 β -HSD2 no cuenta con un cristal, por lo que el modelo 3D para el Docking Molecular fue elaborado utilizando redes neuronales en el programa Alphafold. Adicionalmente, se realizó el acoplamiento molecular con la carbenoxolona, la cual es un inhibidor no selectivo para ambas enzimas, También, se hizo la dinámica molecular de la carbenoxolona con las tres estructuras proteicas, el tiempo de simulación fue de 100 nanosegundos en los cuales se pudo observar el acoplamiento adecuado del ligando y la proteína reflejado en la disminución de la fluctuación en el cambio de la posición de los átomos al final de la simulación. Finalmente, con base a estos resultados se diseñaron una serie de criterios a considerar en el diseño de nuevos inhibidores con capacidad dual en ambas direcciones de la 11 β -HSD1 o selectivos hacia una de las isoenzimas.

1.0 ANTECEDENTES

1.1 Enfermedades de alta prevalencia y mortalidad.

La salud y el bienestar de la población es uno de los temas relevantes en la actualidad como se puede ver reflejado en uno de los objetivos de desarrollo sostenible de la Agenda 2030 proyectados por la ONU, en concreto la reducción de la mortalidad por enfermedades no contagiosas [1]. En el área de las ciencias naturales, los esfuerzos para cumplir dicho objetivo yacen en la búsqueda de fármacos y el desarrollo de nuevos tratamientos, la investigación sobre los mecanismos moleculares y blancos terapéuticos involucrados en enfermedades con altos índices de prevalencia y mortalidad. Con base a la información y base de datos de la [Institute for Health Metrics and Evaluation](#) (Figura 1), la tendencia en muertes en las últimas décadas cambió con respecto a 1990; actualmente prevalecen enfermedades no contagiosas como causas líderes de deceso, destacando el cambio de muertes relacionadas a diabetes (del puesto 10 al 5), así como la permanencia de las enfermedades cardiovasculares y neoplasia, en primer y segundo lugar respectivamente [2].

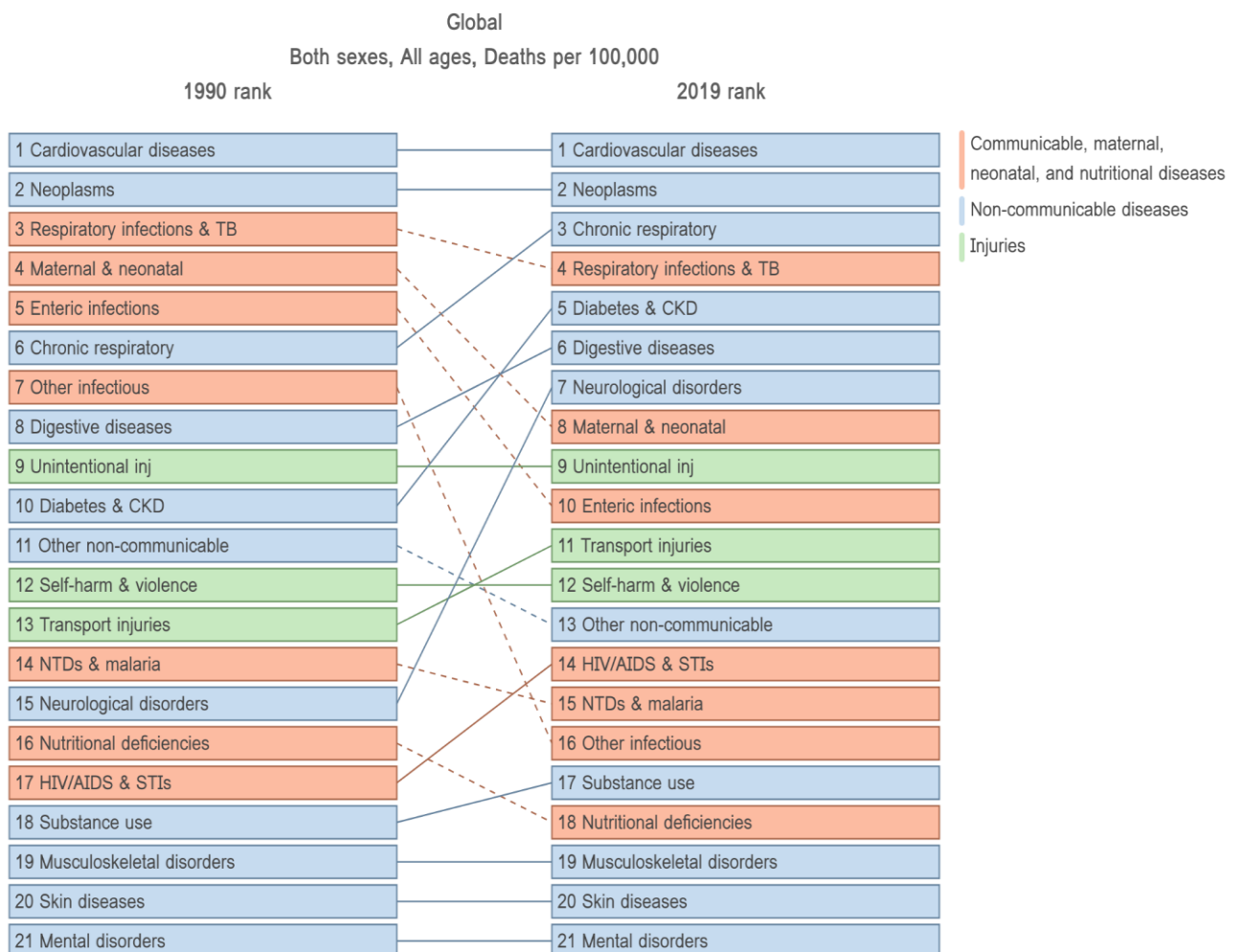


Figura 1. Evolución de las principales causas de muerte a nivel mundial en el periodo de 1990 y 2019. Tomado de [2]

Por otro lado, según datos de la OMS, en México durante el 2021 se reportó una tendencia similar a la mundial donde prevalecen aquellas enfermedades no contagiosas, donde destacan las cardiovasculares, diabetes mellitus, y neoplasia maligna (Figura 2) [3].

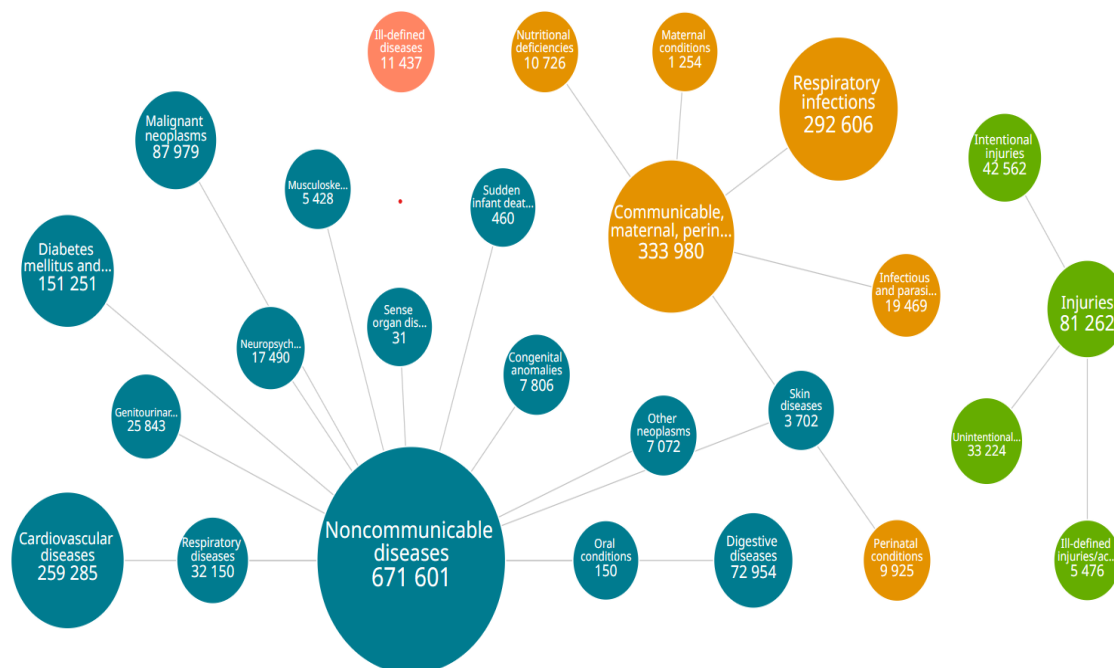


Figura 2 Número de muertes anuales en México durante el 2021 por distintas enfermedades. Tomado de [3]

Las hidroxisteroides deshidrogenasas (HSDHs) son una familia de enzimas involucradas en la modificación de compuestos esteroideos y que se encuentran relacionadas a varias de las patologías mencionadas, en concreto las 11β -HSDs son un blanco terapéutico ideal para enfermedades metabólicas [4,5].

1.2 Estructura y función de las HSDHs

Las hidroxisteroide deshidrogenasas son oxidorreductasas dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NAD(H)/NADP(H)) que catalizan la reducción de un grupo carbonilo a un hidroxilo dentro del esqueleto esteroideal con un alta regio y estereoselectividad. Comúnmente existen como homodímeros u homotetrámeros de 250 a 300 residuos, donde en el N-terminal se encuentra el sitio de unión al cofactor y en el C-terminal se ubica el dominio catalítico [6]. Su distribución en la naturaleza es ubicua, se han identificado estas enzimas en microorganismos, plantas y animales, además que se han utilizado en cultivos para la biocatálisis y como herramienta analítica, en la determinación y cuantificación de ácidos biliares [7]. En animales, las HSDHs están involucradas en la biosíntesis de hormonas esteroideas, en concreto se encargan de regular la concentración de

ligandos de receptores hormonales mediante la activación y desactivación de las hormonas mediante reacciones de oxidorreducción, por lo que controlan la transactivación del receptor esteroideo y ejercen una regulación sobre la transducción de señales genómicas y no genómicas [8,9]

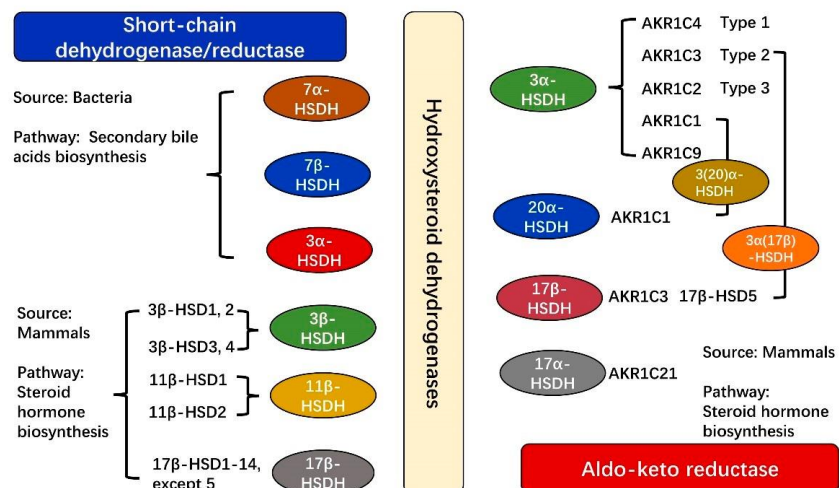


Figura 3 Clasificación de las HSDH en la familia de las aldo-ceto reductasas (AKR) y las deshidrogenasas de cadena corta (SDR), origen y vía de biosíntesis. Tomado de [10].

Las HSDHs se pueden subclasificar en dos superfamilias dependiendo de su estructura (Figura 3); las aldo-ceto reductasas (AKR) que están constituidas por un promedio de 320 residuos plegados para formar un barril (α/β)₈, y se caracterizan por tener una amplia selectividad por diferentes sustratos como aldehídos de azúcares, ceto-esteroides y ceto-prostaglandinas. Por otro lado, las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR) tienen un núcleo compuesto por siete láminas β y α hélices envolviéndolo, formando dos plegamientos de Rossman, los cuales son dominios estructurales que se unen a la coenzima (Figura 4 A y B). La identidad entre las SDR es del 23-53% pero todas conservan un plegamiento Rossman como núcleo. Ambas superfamilias difieren en el modo de unión a la coenzima y en el mecanismo enzimático de reacción [10].

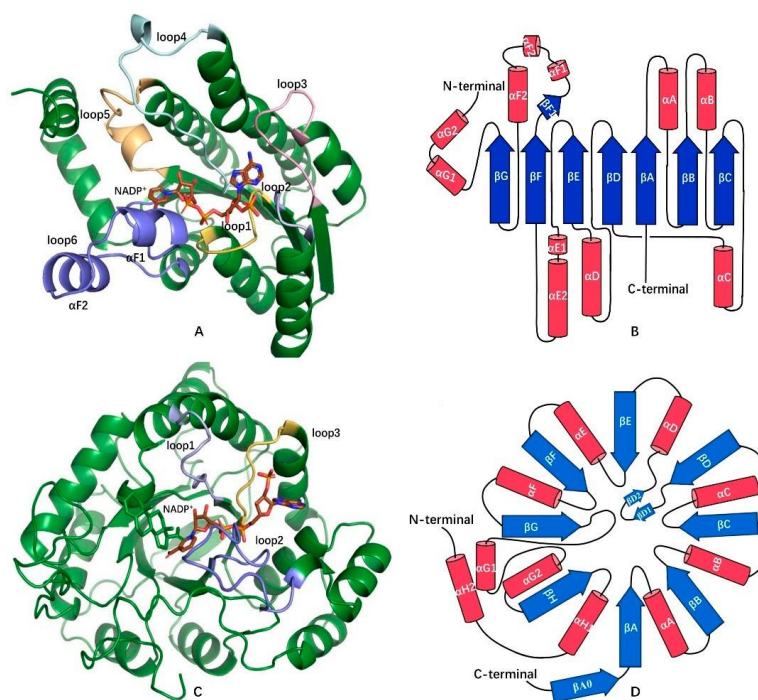


Figura 4 Comparación de la estructura (A, C) y patrón de plegamiento (B, D) de las HSDHs de las superfamilias SDR y AKR. Tomado de [10].

1.2.1 Mecanismo catalítico de las HSDHs AKR

Mediante estudios de cinética enzimática, cristalografía y mutagénesis, se han determinado los aminoácidos que participan en la tétrada catalítica de las AKR para la reducción de grupos hidroxilo en sus respectivos aldehídos o cetonas. La tétrada conservada está compuesta por ASP-TYR-LYS-HIS. La secuencia de formación de los complejos inicia siempre con la unión de la coenzima mediante el residuo de ASP y culmina con la liberación del producto de esta. Por otro lado, el residuo de TYR hace contacto con el sustrato y su pérdida deja a la enzima sin actividad catalítica, la mutación en ASP y LYS también impiden la catálisis, sin embargo estos no interaccionan con el esteroide sino que su ausencia cambia la conformación aniónica del sitio activo [10,11].

El mecanismo que se ha propuesto es el de “empuje y retiro” (Figura 5), en la reducción la TYR catalítica tiene un carácter ácido, comienza con la transferencia de un hidruro al carbonilo aceptor, seguido de la protonación del carbonilo por Tyr mediante un relevo de protones que involucra HIS. En la dirección de oxidación la TYR es desprotonada por la LYS y el anión fenolato remueve un protón del alcohol con la transferencia de un hidruro al cofactor oxidado [12].

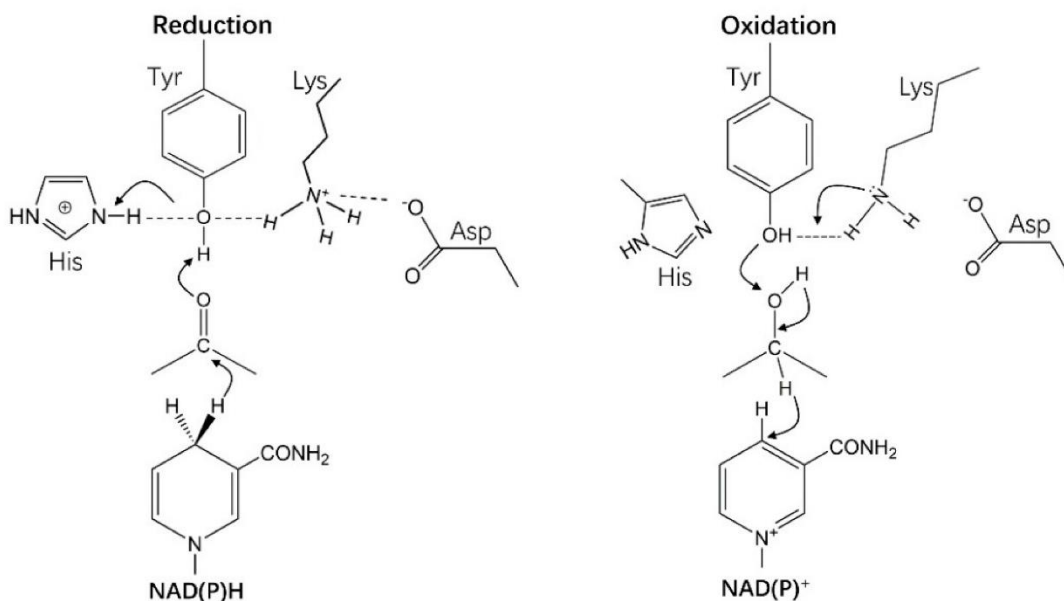


Figura 5 Mecanismo catalítico de las HSDHs de la superfamilia AKR. El sentido de la reacción depende del pH. Tomado de [12]

1.2.2 Mecanismo catalítico de las HSDHs SDR

La función catalítica de esta superfamilia consiste en el patrón TYR-X-X-X-LYS, donde en la mayoría de las enzimas la triada catalítica se compone de SER-TYR-LYS. En la Figura 6, la tirosina es un residuo catalítico y la lisina cumple dos roles, orientar al motivo de la coenzima y disminuir el pK_a de la TYR mediante una fuerte influencia electrostática. El residuo de serina juega un papel en la estabilización de las especies reactivas como un paso de la catálisis [13]. En el mecanismo catalítico (Figura 6), primero la lisina se une a NAD(H) y disminuye el valor de pK_a de la Tyr la cual se desprotona e interactúa con el carbonilo del sustrato, el intermediario se estabiliza por un puente de hidrógeno de la serina, después la tirosina desprotonada actúa como una base catalítica extrayendo el hidrógeno del C-OH y al mismo tiempo NAD⁺ acepta un hidrógeno liberado por el carbono a reducirse [10].

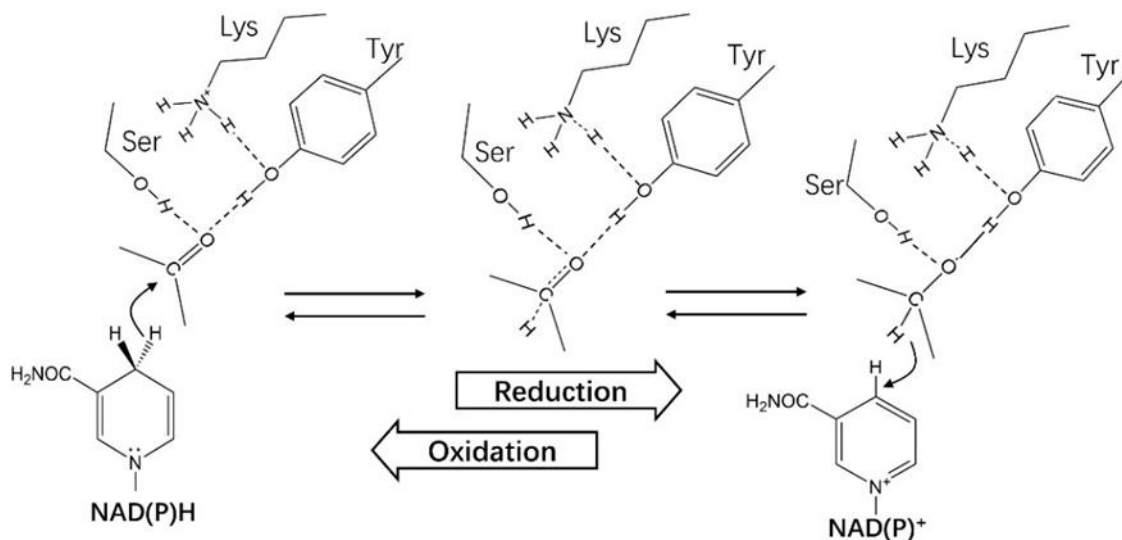


Figura 6 Mecanismo catalítico de las HSDHs de la superfamilia SDR. Tomado de [10]

1.3 Las 11 β Hidroxiesteroide deshidrogenasas

Las 11 β hidroxiesteroide deshidrogenasas son enzimas pertenecientes a la superfamilia del alcohol deshidrogenasas de cadena corta, su función biológica es interconvertir la forma activa de glucocorticoides endógenos en sus derivados deshidrogenados. La isoenzima 2 (11 β -HSD2) depende del cofactor NAD para realizar su actividad de deshidrogenasa, cataliza la oxidación de cortisol y corticosterona en cortisona y 11-dehidrocorticosterona, respectivamente. Por otro lado, la isoenzima 1 (11 β -HSD1) requiere de NADPH como cofactor para llevar a cabo su actividad oxido-reductasa al reducir la cortisona y la 11-dehidrocorticosterona (Figura 7) [14], sin embargo, esta isoforma tiene una capacidad bidireccional, observándose su actividad deshidrogenasa en homogeneizados celulares y cuando se ha purificado [15].

1.3.1 Receptores de glucocorticoides (RG) y mineralocorticoides (RM)

La expresión de las isoformas de 11 β -HSD va de la mano con la expresión de receptores nucleares de mineralocorticoides y glucocorticoides, la isoenzima 1 se distribuye en hígado, placenta, músculo esquelético, tejido adiposo y en las islas de Langerhans, en el páncreas [16]. Mientras que la isoenzima 2 se expresa en riñón, colon, placenta y en la glándula adrenal. Las enzimas modulan los niveles locales de glucocorticoides y por lo tanto su acceso a los receptores, lo que los convierte en interruptores moleculares para la expresión (mediante RM) o represión de genes (mediante RG), además estos receptores se encargan de regular alrededor del 2% del genoma humano por acción de los glucocorticoides, aunque no de manera exclusiva [16–18].

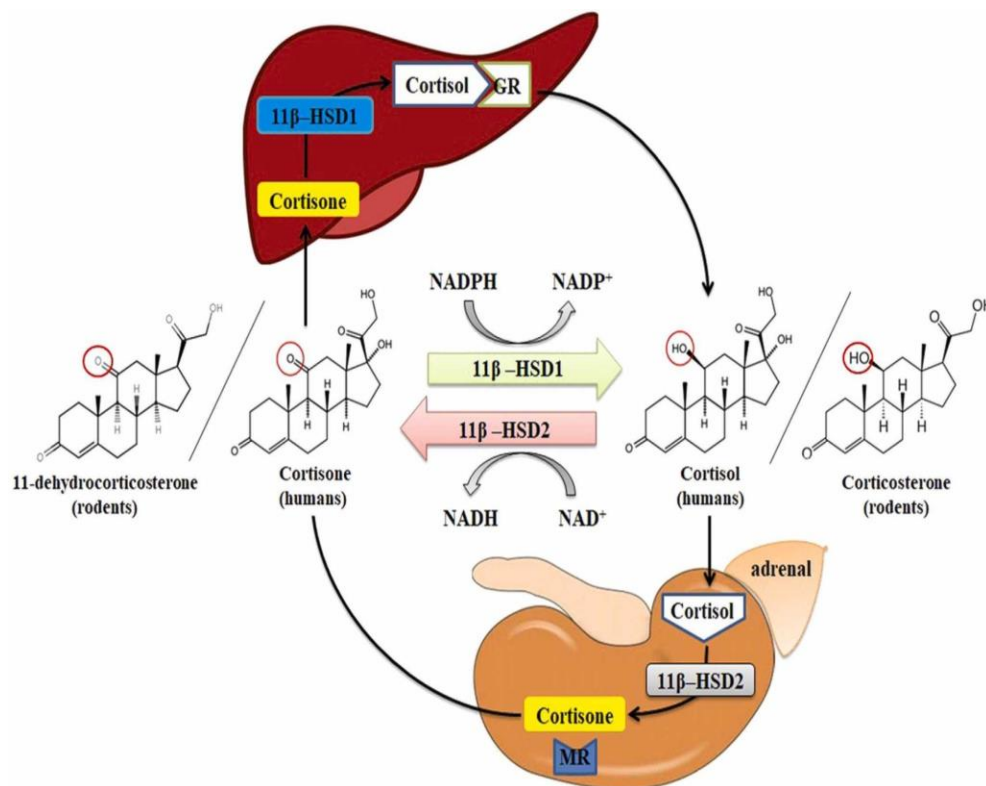


Figura 7 Interconversión del glucocorticoide inactivo (cortisona y dehidrocorticosterona) en glucocorticoide activo (cortisol y corticosterona) en los órganos donde la expresión de las 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasas es mayor. Tomado de [14]

1.3.2 11β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1

En humanos y ratones esta proteína está compuesta por 292 aminoácidos con una masa de 34 kDa, los aminoácidos clave para su actividad catalítica son TYR 183, LYS 187 y SER 170 (Figura 8) [18]. Su ubicación dentro de la célula es en la membrana del retículo endoplásmico (RE), orientado de tal forma que el dominio catalítico se encuentre dentro del lumen del RE. *In vivo* se realiza la actividad de la oxidoreductasa; sin embargo, al purificarla y obtener homogenizados celulares la direccionalidad se torna hacia la deshidrogenasa; este fenómeno puede explicarse por la disponibilidad de la coenzima. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (H6PD) tiene un homólogo en el lumen del RE con la capacidad de catalizar los dos primeros pasos de la vía de las pentosas fosfato, por lo consiguiente puede suplir a la 11β-HSD1 de NADPH mediante sus sustratos, glucosa-6-fosfato y NADP⁺, la H6PD mantiene una concentración suficiente de NADPH para permitir la actividad catalítica de cortisona a cortisol [19,20]

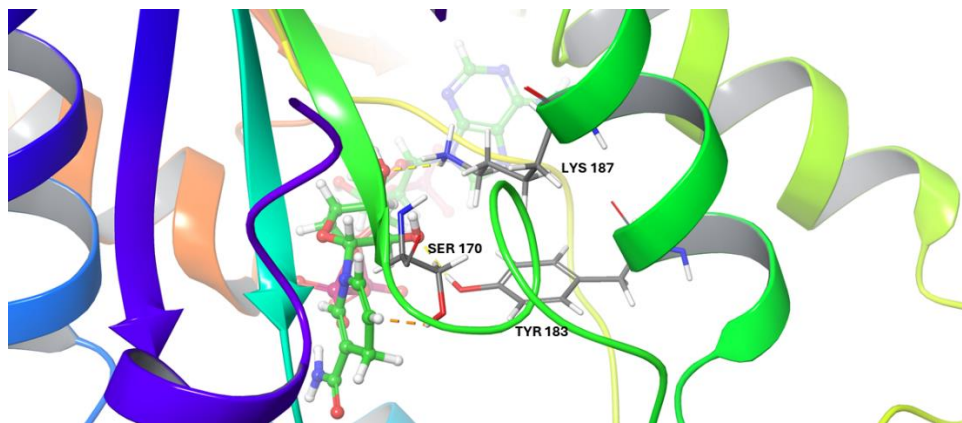


Figura 8 Sitio activo de la 11 β -HSD1, conformado por los residuos TYR 183, LYS 187 y SER 170

1.3.3 11 β Hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2

La 11 β -HSD2 es una proteína de 44 kDa constituida por 405 aminoácidos, tiene una identidad de secuencia del 18% con respecto a la isoforma 1 [19]. Esta enzima es la fuente principal de cortisona y glucocorticoides administrados de manera exógena para la isoenzima 1, puesto que primero deben ser deshidrogenados para ser activados, por lo que existe un reciclaje de la hormona esteroidea en los tejidos [21]. La enzima es intrínseca a la membrana del RE, el NH₂ terminal se encuentra dentro del lumen mientras que el COOH terminal se encuentra del lado del citoplasma, con una orientación opuesta a la de la 11 β -HSD1, por lo que el sitio activo de la 11 β HSD2 se orienta hacia el citoplasma [22]. Actualmente no se cuenta con un cristal de la proteína por lo que para su estudio bioinformático se opta con realizar modelos 3D con Alphafold [23].

1.4 Inhibidores de las 11 β HSDs

La inhibición de ambas isoformas de 11 β -HSD se ha estudiado desde el descubrimiento de los metabolitos del regaliz, sin especificidad. Actualmente se han sintetizado varios inhibidores selectivos para ambas enzimas con el propósito de aliviar enfermedades metabólicas, sin embargo, la mayoría se encuentra en fases preclínicas [24,25]. También se han identificado inhibidores endógenos para la actividad deshidrogenasa de la 11 β -HSD2 y para ambas actividades de la 11 β -HSD1 [26].

1.4.1 Inhibidores de la 11 β HSD1

La inhibición de 11 β -HSD1 es un tema importante al estar involucrado en diversas enfermedades, se considera que los inhibidores de esta enzima inhiben parcialmente la conversión de cortisona a cortisol en tejidos sin afectar la concentración normal de cortisol en el plasma sanguíneo [27]. La tabla 1 muestra algunos de los inhibidores reportados para la isoenzima 1, la carbenoxolona es comúnmente utilizada en estudios de inhibición y ha sido empleada como medicamento para mejorar la sensibilidad a insulina y la fluidez verbal en

pacientes con diabetes tipo 2 [28]. En la Figura 9 se muestran las estructuras de algunos de los inhibidores selectivos de la 11 β HSD1 reportados en la literatura, todos en fases preclínicas como potenciales fármacos [15,24,29–31].

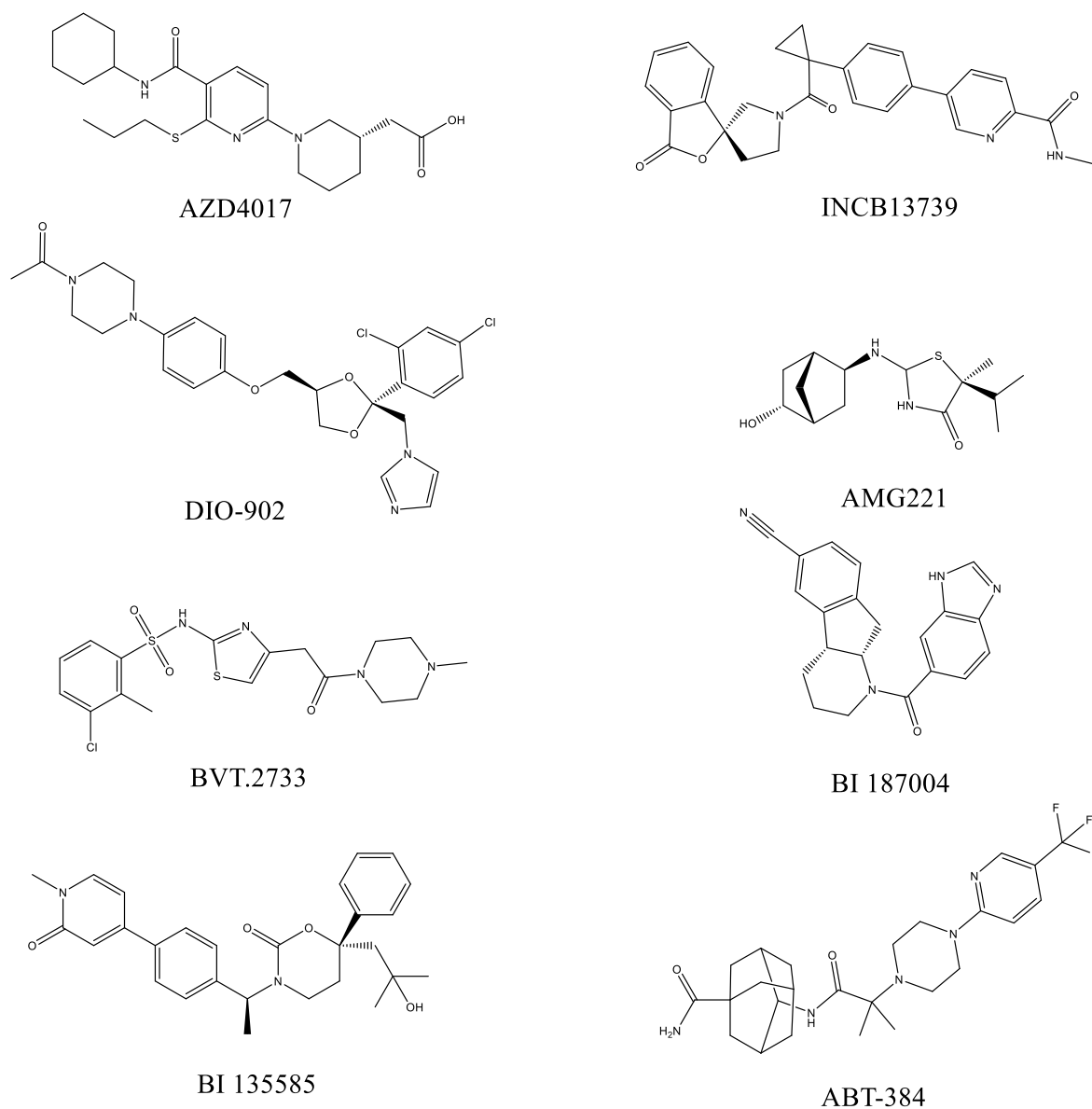
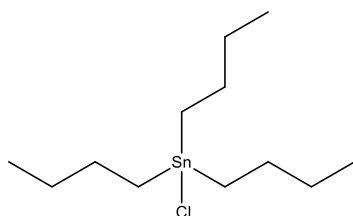


Figura 9 Inhibidores selectivos de la 11 β -HSD1 encontrados en la literatura

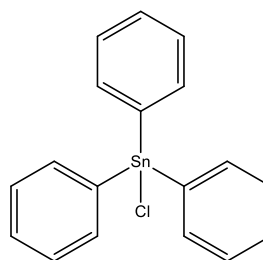
1.4.2 Inhibidores de la 11 β -HSD2

La inhibición de la isoenzima 2 tiene un efecto significativo sobre varios tejidos del cuerpo, se puede destacar el aumento de la retención de sodio y agua en el riñón, en la placenta puede alterar su función y alterar el desarrollo del feto, en testículos altera la esteroidogénesis, y en el endotelio vascular estimula el proceso proinflamatorio [32].

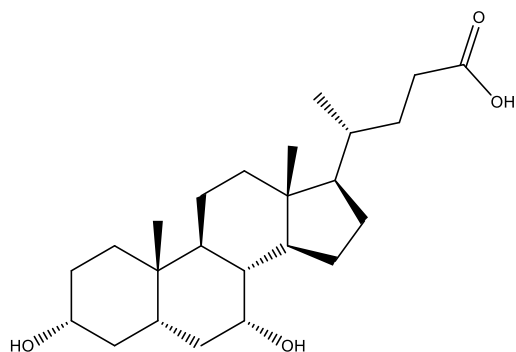
Los primeros inhibidores reportados de esta enzima provienen de extractos naturales como el ácido glicirretínico del regaliz, que es no específico para ambas isoformas, y el gossypol, de las semillas de algodón cuya mezcla enantiomérica posee también un efecto de infertilidad masculina. Algunos inhibidores de la 11 β HSD2 son disruptores endocrinos son ftalatos, organotinas, per y polifluoroalkilos, bifenilos policlorados y compuestos organoclorados [32–34]. Debido a los posibles efectos adversos, es necesario identificar sustancias exógenas que puedan inhibir a esta enzima y diseñar fármacos selectivos sobre la isoforma 1, algunos estudios se han enfocado en realizar docking molecular de compuestos aprobados por la FDA en la 11 β -HSD2 para dilucidar posibles efectos adversos [35]. En la Figura 10 se presentan algunos de los inhibidores selectivos para la 11 β -HSD2 reportados en la literatura [18,36,37].



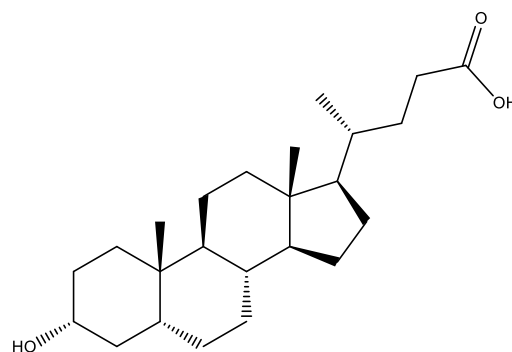
Tributilo de estaño



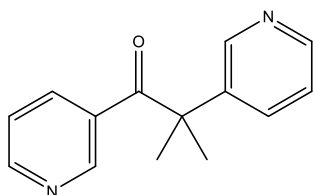
Trifenilo de estaño



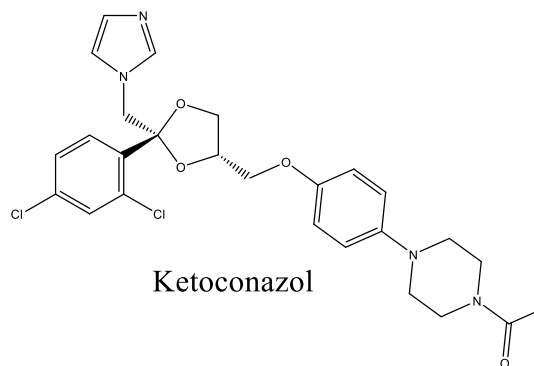
CDCA



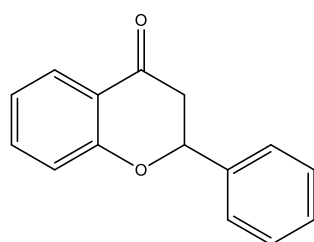
Ácido litocolico



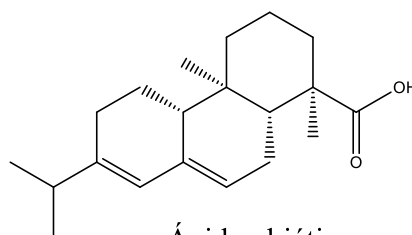
Metirapona



Ketoconazol



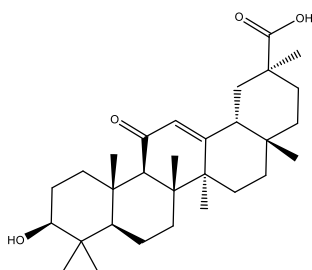
Flavanona



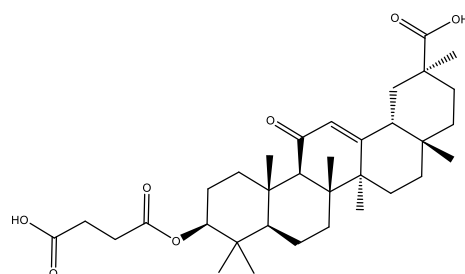
Ácido abiético

Figura 10 Inhibidores selectivos de la 11 β -HSD2

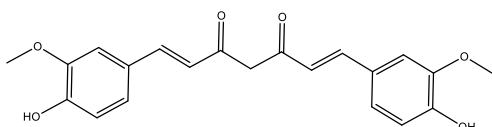
1.4.3 Inhibidores no específicos de la 11 β -HSD1 y 11 β -HSD2



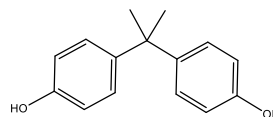
Ácido Glicirretínico



Carbenoxolona



Curcumina



Bisfenol A

Figura 11 Inhibidores no selectivos de las 11 β -HSDs.

1.5 Patologías asociadas a glucocorticoides por la acción de las 11 β -HSDs

Los glucocorticoides cumplen un papel importante en la homeostasis del cuerpo, el balance entre su forma inactiva e inactiva, de cortisona y cortisol respectivamente, influye en la regulación de procesos como el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, presión arterial, modulación de la respuesta inmune, y mantener el balance electrolítico. Los GC pueden unirse a la membrana celular y mitocondrial, alterando las propiedades fisicoquímicas de la membrana y la función de proteínas de membrana, en particular en la mitocondria puede conllevar a cambios en la producción de ATP y por ende impedimento en la función celular [5]. El exceso de cortisol ha sido relacionado con el desarrollo de componentes del síndrome metabólico como dislipidemia, diabetes tipo 2, hipertensión, cáncer y obesidad, a esta última se le ha atribuido la 11 β -HSD1 como el principal factor etiológico debido a su papel en la diferenciación de adipocitos [38]. Tanto un exceso como decremento en el nivel de glucocorticoides por la acción o defecto de ambas enzimas puede tener efectos adversos sobre tejidos específicos, viéndose reflejado en distintas enfermedades. La Figura 12 resume las patologías asociadas a ambas enzimas.

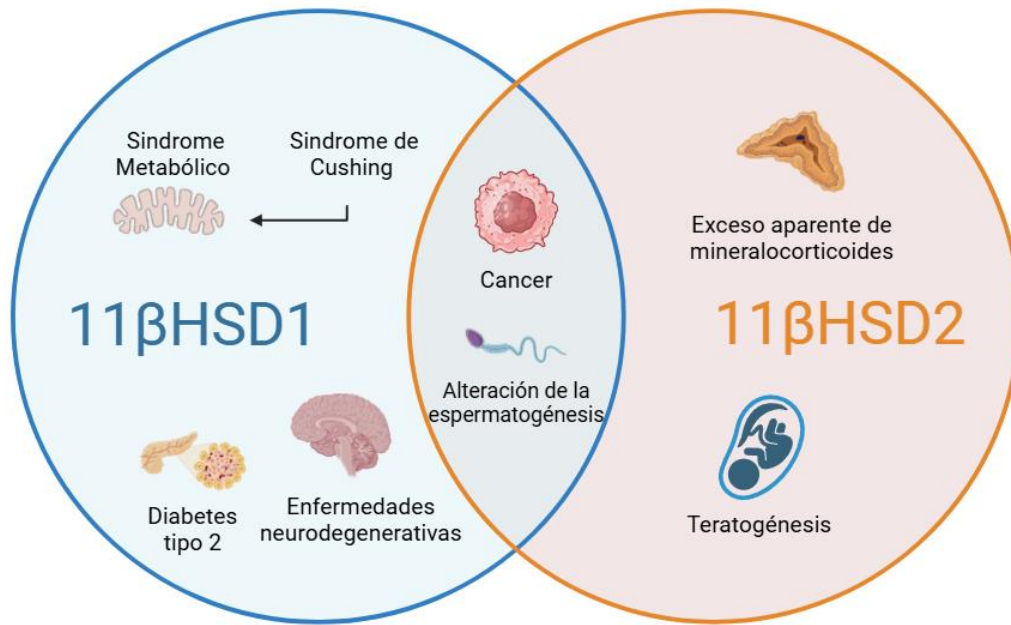


Figura 12 Enfermedades y condiciones relacionadas al malfuncionamiento de las 11β-HSDs.

1.5.1 Enfermedades neurodegenerativas

El eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) es el sistema neuroendocrino encargado de secretar cortisol, siguiendo un ritmo diurno y con un aumento en respuesta al estrés, su liberación cesa por un mecanismo de retroalimentación negativa posiblemente mediado por 11β-HSD1 [39]. En el cerebro la expresión de la isoenzima 1 se localiza en el cerebelo, el hipocampo y la corteza cerebral, siendo esta última la de mayor concentración. En el hipocampo se expresan los receptores RM y RG, el primero se encuentra ocupado por glucocorticoides durante el estado basal y permite la formación de la memoria episódica, mientras que RG por su menor afinidad permanece desocupado hasta que exista un aumento de las hormonas esteroideas debido al estrés, lo que en su lugar provoca el condicionamiento al miedo en la amígdala [27,40,41].

El decaimiento cognitivo que ocurre en el envejecimiento de mamíferos ha sido relacionado con un aumento en la actividad de 11β-HSD1 en el cerebro, el encogimiento del hipocampo es un cambio estructural notable; en estudios con ratones *knockout* para el gen que codifica a esta enzima muestran una protección ante la pérdida de memoria y funciones cognitivas. Además, se han reportado polimorfismos del gen HSD11B1 en nativos americanos que se correlacionan con un aumento a padecer Alzheimer [28,41].

En ratones de la cepa Tg2576, un modelo de la enfermedad de Alzheimer, se les suministro un inhibidor potente de 11β-HSD1 (UE2316) y se observó una disminución en la acumulación de placas β amiloides en la corteza cerebral y la amígdala, mejorando habilidades cognitivas en pruebas de memoria, este efecto puede atribuirse a la disminución intracelular de glucocorticoides y su acceso a RM y RG. No obstante, la inhibición de 11β-

HSD1 solo muestra resultados positivos en el tratamiento de la enfermedad en etapas tempranas [42].

1.5.2 Diabetes mellitus tipo 2

La presencia de glucocorticoides puede oponerse a la acción de la insulina al contribuir a la hiperglucemia, puesto que promueve la expresión de enzimas claves en la gluconeogénesis como el fosfoenolpiruvato carboxiquinasa que fosforila piruvato en fosfoenolpiruvato, y a la glucosa 6-fosfatasa que hidroliza glucosa-6-fosfato liberando glucosa [15]. La actividad de 11 β -HSD1 en tejido adiposo se encuentra aumentada en roedores y humanos con obesidad, resultando en dislipidemia, hipertensión y diabetes tipo 2 [43]. El compuesto BVT-116429 es un inhibidor de 11 β -HSD1 en fase preclínica, ha demostrado una alta biodisponibilidad en el tejido adiposo y selectividad por el mismo frente a las enzimas hepáticas [44].

En pacientes con diabetes tipo 2, la inhibición de 11 β -HSD1 por administración tópica en heridas crónicas podría ser un tratamiento para la cicatrización, al tener niveles bajos de glucocorticoides permite la proliferación de queratinocitos [15]. Actualmente, el tratamiento de la diabetes tipo 2 tiene distintas vías posibles; la 11 β -HSD1 como blanco terapéutico para esta enfermedad tiene varios desafíos, incluida la taquifilaxia y las dosis crónicas que pueden tener un efecto sobre el eje HPA, además de que los mecanismos moleculares de varios inhibidores como antidiabéticos no están completamente estudiados [15,43].

1.5.3 Síndrome de Cushing

El síndrome de Cushing es una enfermedad que afecta a múltiples sistemas del cuerpo, resultado de una secreción excesiva de cortisol, esta puede ser causada por carcinoides en la tiroides, timo y pulmón, o por la administración crónica de GC. En particular, el tumor pituitario secretor de hormona adrenocorticotrópica es la causa más común de esta enfermedad [45]. Algunos de los síntomas relacionados son similares a enfermedades metabólicas además de aumentar el riesgo de complicaciones cardiovasculares y mortalidad [46]. En el modelo de rata obesa Zucker, que es representativa para el síndrome de Cushing, se ha observado que los niveles altos de cortisol circundante tienen un efecto distinto en diferentes tejidos, en el hígado la actividad de la 11 β -HSD1 se ve disminuida mientras que en tejido adiposo aumenta y la acumulación de grasa provoca obesidad central. La regulación tejido-específica de glucocorticoides mediante la expresión de 11 β -HSD1 en el síndrome de Cushing sigue siendo estudiada, y esta enzima como diana farmacológica para tratar la sintomatología de esta enfermedad aún se encuentra en debate [45,47].

1.5.4 Cáncer

La mayoría de tipos de células cancerígenas tienen la capacidad de producir cortisol donde las 11 β -HSDs comúnmente se encuentran desreguladas a la alta en la tipo 1 o reguladas a la baja en la tipo 2, el resultado de este desbalance es el aumento de la biodisponibilidad local

de cortisol y su probable interacción con el receptor de mineralocorticoides, que en este caso puede desencadenar la inhibición de la proliferación de linfocitos citotóxicos CD8⁺ [48].

El cáncer de mama triple negativo es aquel donde las células malignas carecen de receptores de estrógenos α , receptores de progesterona y pérdida de la sobreexpresión del receptor de factor de crecimiento epidérmico humano, al tener un número reducido de dianas farmacológicas estos tumores tienden a ser resistentes a quimioterapia. Los glucocorticoides pueden ser una vía alternativa de tratamiento ya que sus receptores se encuentran expresados de forma abundante en este cáncer, además de que están involucrados en rutas relacionadas al carcinoma como la supervivencia celular, la transición epitelio-mesenquimal y la adhesión celular [49]. En otras lesiones como carcinoma ductal mamario la proporción 11 β -HSD1/11 β -HSD2 es mayor que tejidos sanos y juegan un papel importante en la progresión de la tumorigénesis [50].

En el carcinoma colorrectal se expresa la 11 β -HSD2, su regulación a la baja ha sido asociada con la transformación neoplásica de adenomas, se ha probado la inhibición de esta enzima con ácido glicirrínico para suprimir el crecimiento del tumor [34]. No obstante otros estudios sugieren que la sobreexpresión de esta enzima no altera la proliferación celular pero si puede promover la progresión y metástasis a través de la vía Fgfbp1-AKT, siendo la primera una chaperona con posibilidad de ser una diana farmacológica además de la 11 β -HSD2 [51].

1.5.5 Exceso aparente de mineralocorticoides

El estudio de las 11 β -HSDs y descubrimiento de sus isoformas comenzó a partir de las observaciones realizadas sobre una enfermedad autosomal recesiva en infantes, quienes presentaban hipertensión, hipopotasemia, alcalosis metabólica y dificultades para crecer [17,52]. La etiología de este síndrome se le atribuye a la nula o baja actividad 11 β -HSD2 resultado del gen que la codifica, lo cual provoca un aumento en la activación de los receptores mineralocorticoides mediados por el cortisol como agonista, consecuentemente provoca un aumento en el sodio renal y reabsorción del agua [53]. Se teoriza que la acción del cortisol como agonista de RM es debido a la ausencia de NADH producido durante la inactivación del cortisol por la 11 β -HSD2, el cofactor podría permitir que el cortisol ocupe al receptor sin imitar la acción de la aldosterona [52]. La inhibición de la 11 β -HSD2 con ácido glicirrínico puede llevar a síntomas similares a los del exceso aparente de mineralocorticoides, por lo tanto se tiende a evitar a esta enzima como diana farmacológica [54].

1.6 Bioinformática de las 11 β -HSD1 y 11 β -HSD2

La aplicación de la bioinformática al estudio de estas enzimas se enfoca principalmente en la obtención de posibles nuevos fármacos selectivos hacia la 11 β -HSD1 con baja o nula actividad para la enzima tipo 2. En el caso de la isoenzima 1, los cristales disponibles de la

proteína se encuentran cristalizados con ligandos que se encuentran en vecindad al cofactor y al residuo catalítico TY187 además de una interacción estabilizante con SER170 [55]. Se ha realizado docking con varios inhibidores reportados por distintas empresas, todos siendo específicos y con un mecanismo de unión basado en imitar el carbonilo de la cortisona e interactuar con SER170 y TYR183, sin embargo, otras investigaciones señalan que en algunos casos estas cetonas pueden ser sustratos. Las amidas, sulfonamidas y triazoles como clase estructural, tienden a mejorar la interacción con la 11 β -HSD1 [56]. También se ha realizado docking con el cristal con PDB ID: 6NJ7 con terpenoides con la misma estructura planar, el eufuano (mostrado en azul) y el lanostano (mostrado en verde) tenían una diferencia de ocho veces en cuanto actividad, y tenían la misma estructura planar. Las interacciones observadas para el sesterterpeno eufano (Figura 13) fueron puentes de hidrógeno con THR124, SER170 y TYR183 dentro del bolsillo activo y en el exterior del mismo se acopló la cadena lateral de esta molécula [57].

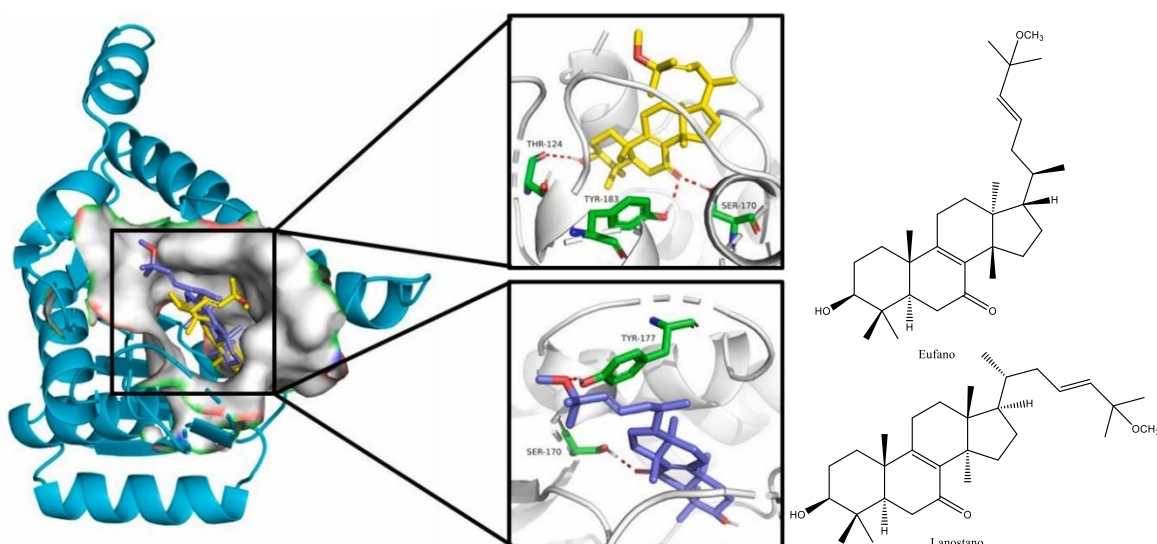
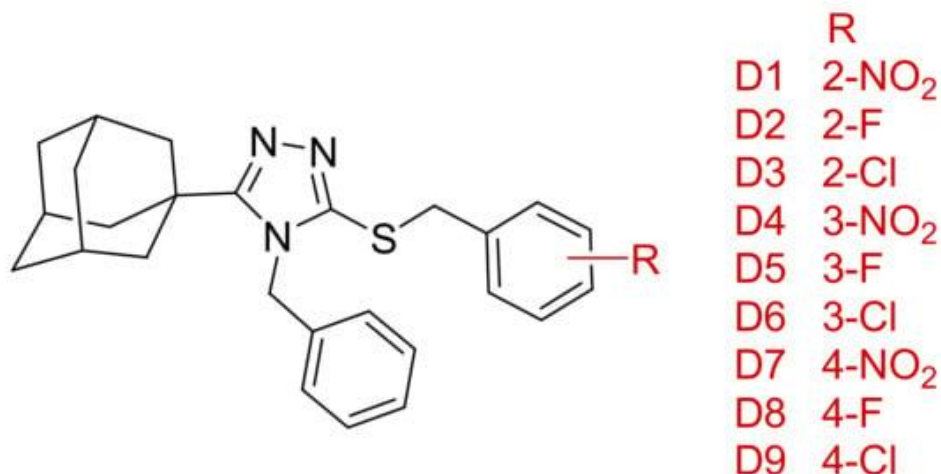


Figura 13 Docking molecular en el cristal 6NJ7 de la 11 β -HSD1 de dos terpenoides. En azul el sesterterpenoide eufano y en verde un triterpenoide lanostano. Tomado de [57].

Empleando moléculas con evidencia experimental con actividad inhibitoria de la 11 β -HSD1 se puede realizar docking con estructuras similares para predecir su potencial biológico, derivados 1,24-triazol con un linker de adamantano (Figura 14) han sido diseñados bajo este criterio y estudiados *in silico* como nuevos inhibidores de la isoenzima 1, los binding affinity scores que obtuvieron rondaron entre -7.98 a -8.48 kcal/mol, y se destacaron interacciones del triazol con los residuos de aminoácidos como puentes de hidrógeno con SER170 y TYR183 tras incrementar en un carbono la longitud entre el triazol y el fenilo, adicionalmente se mantuvieron interacciones hidrofóbicas con TYR177 y TYR183 [58].



*Figura 14 Derivados de 1,2,4-triazoles con linkers de adamantano diseñados como inhibidores de la 11 β HSD1.
Modificado de [58]*

Un estudio de docking molecular realizado con el cristal con PDB ID:2bel de la isoenzima 1 con una familia sintética de eufenoles, compararon el acoplamiento de un derivado sintético eufenol sobre la enzima humana y de ratón, los resultados bioinformáticos concordaron con los bioensayos realizados donde el eufenol reportado inhibía con mayor diferencia a la enzima de ratón [59].

En el caso de la 11 β -HSD2, no se cuenta con alguna estructura cristalizada de la enzima por lo que las metodologías para realizar estudios de docking se parte primero del modelado de la proteína por homología, en este sentido, es importante que los modelos mantengan los dominios GXXXGXXG el cual se asocia con el cofactor y YXXXXK que constituye al centro catalítico además de un residuo de serina que permite orientar al sustrato [60]. La mayoría de los estudios emplean el cristal de la 11 β -HSD1 con código PDB: 3HFG por su resolución de cristal de 2.3Å y utilizan el software Molecular Operating Environment (MOE) [61].

La unión del cofactor es importante ya que a diferencia de la isoenzima 1, el NAD⁺ debe ser acoplado dentro del modelo, debido a esto se debe realizar el docking del cofactor con la 11 β -HSD2, en modelos creados por homología la unión de NAD⁺ tiene una conformación 3D similar a la NADPH en los cristales de la 11 β -HSD1, según estas predicciones NAD⁺ puede formar puentes de hidrógeno con ASP91, PHE94, ALA168, HIS170, TYR232 y THR267 (Figura 15) [62].

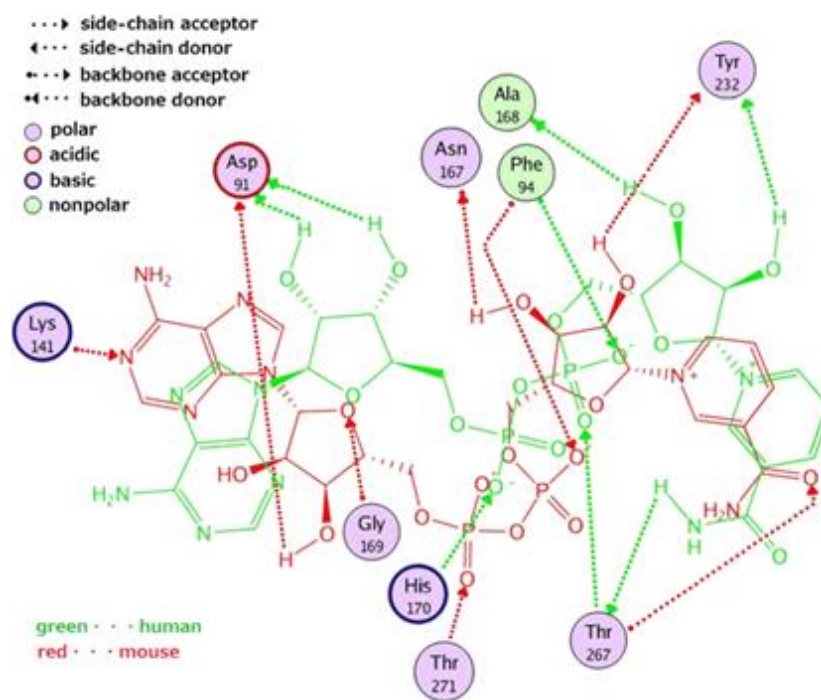


Figura 15 Interacción del cofactor NAD^+ con los residuos de la 11β -HSD1 en ratón (rojo) y humano (verde). Modificado de [54]

Dada las patologías relacionadas a la 11β -HSD1, sobre todo las alteraciones en el metabolismo, se puede considerar una diana farmacológica relevante, por lo que la identificación de criterios para el diseño inhibidores específicos y duales podría ser detallado mediante estudios de bioinformática. En el caso de la 11β -HSD2 la obtención de inhibidores específicos para el tratamiento de cáncer sobre todo aquellos que provengan de células con alta expresión en MR podría ser una alternativa, sin embargo, los efectos adversos de su inhibición la vuelven una antidiagona. Estudiar la actividad de inhibidores duales podría dar paso a la comprensión de aquellas interacciones con las enzimas que puedan promover la especificidad hacia una de las isoformas.

2.0 OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar la relación entre la interacción de sustratos endógenos y la carbenoxolona a nivel bioinformático en la 11 β -HSD1/2.

Objetivos particulares

- Analizar el docking de los sustratos endógenos de la 11 β -HSD1 en su forma de reductasa y de oxidasa
- Analizar el modelo de redes neuronales de 11- β -HSD2 como objeto de estudio de docking molecular
- Detallar la dinámica molecular de la carbenoxolona de la 11 β -HSD1 y 11 β -HSD2.
- Diseñar criterios de inclusión para el diseño de inhibidores duales y selectivos.

3.0 METODOLOGÍA

3.1 Consulta y selección de cristales.

Las estructuras de las proteínas fueron obtenidas de la base de datos Protein Data Bank del RCSB [63,64], bajo la búsqueda de “11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase 1”. A la fecha del trabajo se encontraron alrededor de 69,380 estructuras de la 11 β HSD1 humana, dentro de las cuales 56,321 cristales habían sido obtenidos por difracción de rayos X, de estos se seleccionó el cristal 3QQP [63] que se encuentra cristalizado con NADPH por lo que representa la actividad reductasa. Por otro lado, el cristal 2BEL [64] se seleccionó para representar la función oxidasa que puede realizar la enzima al estar cristalizado con NADP, además esta proteína está cristalizada con el inhibidor carbenoxolona, el cual fue utilizado para el posterior docking molecular.

3.2 Alineamiento

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas 11 β HSD1/2 se realizó con la herramienta de Global Alignment del NCBI [65], el número de acceso de las secuencias empleadas fueron NP_005516.1 con 292 residuos para la 11 β -HSD1 y NP_000187.3 con 405 residuos para la 11 β -HSD2. La identidad entre ambas proteínas fue del 20%.

3.3 Preparación de Proteínas

La preparación de las proteínas se realizó utilizando el programa Protein Preparation Wizard de la Suite de Schrödinger [66], la integridad estructural fue revisada y ajustada; se añadieron recurrencias faltantes, así como segmentos de bucle cerca del sitio activo mediante Prime [67,68]. Se añadieron los átomos de hidrógeno a cada proteína para devolverla a su estado original. Los estados de protonación tautomérica de ASP, GLU, LYS e HIS se ajustaron a un pH de 7.4. Las moléculas de agua que se encontraban dentro de una esfera a 5 Å del sitio activo fueron eliminadas. La orientación de los puentes de hidrógeno se ajustó alrededor del sitio activo usando PROPKA a un pH de 7.4 y se eliminaron las moléculas de agua con 1 o 2 puentes de hidrógeno. Finalmente, el complejo proteína-ligando se minimizó utilizando el campo de fuerzas OPLS4 [69], con un RMSD de 0.3 Å.

3.4 Preparación de Ligandos

Los ligandos, tanto sustratos como inhibidor, fueron obtenidos de los cristales seleccionados previamente. Para el docking molecular, fueron preparados utilizando LigPrep [70] de la Suite de Schrödinger, tras obtener las estructuras en 3D se prepararon y cargaron los campos de fuerza OPLS4 [69]. Los centros protonados y estados de ionización posibles de la estructura base se calcularon usando un ionizador a pH de 7.4. Los estereoisómeros se conservaron según las estructuras originales, con un límite de 32 isómeros para cada ligando. Se generaron estados tautomeros y se seleccionaron los confórmers con menor energía para cada ligando.

3.4 Docking Molecular

El docking molecular se llevó a cabo en el módulo de Glide de Maestro [71]. Para la flexibilidad, a los ligandos se les permitió rotaciones adicionales para los grupos hidroxilo en THR, TYR y SER, así como el grupo tiol de los residuos de CYS. Se mantuvo la posición de unión de menor energía de cada ligando. Los docking score fueron realizados de tres maneras: cribado virtual de alto rendimiento (HTVS), precisión estándar (SP) y precisión adicional (XP).

3.5 Dinámica Molecular

Los estudios de dinámica molecular se realizaron con Desmond [72] para evaluar la estabilidad de la interacción de las 11 β -HSD1/2 con la carbenoxolona. La simulación se llevó a cabo dentro de una caja ortorrómbica, situando al complejo proteína-ligando en el centro a una distancia de 10 Å. La caja se solvató con moléculas de agua y con una concentración de 150 mM de cloruro de sodio, simulando condiciones fisiológicas. La energía del sistema se minimizó usando el campo de fuerza OPLS4 [69] con 2000 interacciones, con un criterio de convergencia de 1 kcal/mol/Å. Por último, la simulación se hizo en un intervalo de 100 ns a 300K y presión de 1 bar.

4.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Docking molecular de sustratos e inhibidor de la 11 β -HSD1 con el cristal 3QQP

En primera instancia para los estudios de acoplamiento y poder presentar un marco de referencia se realizó el acoplamiento con los sustratos endógenos, particularmente para la 11 β -HSD1, dada su dualidad de mecanismo, puede funcionar con la cortisona y el cortisol. Específicamente, el cristal 3QQP, tiene como cofactor en su estructura al NADPH, por lo tanto, este simula las condiciones de transformación de cortisona a cortisol, es decir deberá presentar un acoplamiento preferente al primero, para facilitar la salida del producto en este estado de la enzima. Estos sustratos se unen al sitio activo situado en medio del dominio de plegamiento de Rossmann donde ambas moléculas ocupan el mismo bolsillo. En la Figura 16 se puede observar que la cortisona mostrada en color morado y el cortisol mostrado en color gris comparten el mismo espacio al momento de unirse a la enzima, con un docking score de -8.025 y -7.275 kcal/mol respectivamente, con un ligero cambio en la posición y rotación de los enlaces, esto concuerda con la naturaleza reversible de la actividad catalítica de oxidoreductasa de la 11 β -HSD1 y sugiere que el transporte del hidruro del cofactor al sustrato y viceversa, ocurre en el mismo sitio. Así mismo el NADPH (azul claro) se encuentra orientado de tal forma que el anillo dihidropiridínico se encuentra orientado al carbono 11 de ambos glucocorticoides, hecho importante ya que se ha establecido que la formación del complejo enzima-sustrato es dirigido por el acoplamiento previo del cofactor en un mecanismo donde primero ocurre el acoplamiento de NADPH seguido de la unión y transformación del sustrato y por último la salida del cofactor oxidado, por lo que su unión de este en una posición adecuada daría paso a la actividad catalítica tras la unión del sustrato.



Figura 16 Docking molecular de cortisona (morado) y cortisol (gris) en la 11β-HSD1 con el cofactor NADPH (azul claro) (PDB:3QQP)

Al realizar un acercamiento al sitio catalítico de la proteína (Figura 17) se aprecia la interacción los residuos aminoácidos SER 170, TYR 183 y LYS 187, involucrados en la actividad catalítica de la 11β-HSD1, el protón del oxígeno del anillo fenólico de la cadena lateral de la TYR 183 se encuentra en paralelo al oxígeno del grupo carbonilo de la cortisona (morado), a su vez el protón del hidroxilo de la serina se encuentra adyacente a la cetona del carbono 11. Por otro lado, debido al pH del modelo, el grupo amino de la cadena lateral de la lisina se encuentra protonada por lo que puede estabilizar a la lisina durante el acarreamiento del protón. La disposición espacial de los residuos aminoácidos de la triada catalítica permiten la interacción entre el NADPH y el sustrato, así como consigo mismos. La distancia entre los hidruros del anillo dihidropiridínico y el carbonilo es de 4.43 Å. Además, se puede observar en el diagrama 3D la interacción de la cortisona con residuos del bolsillo catalítico como ALA 223, VAL 180, TYR 177 y LEU 126 que permiten que el sustrato se acomode en una pose adecuada para la reducción del carbonilo.

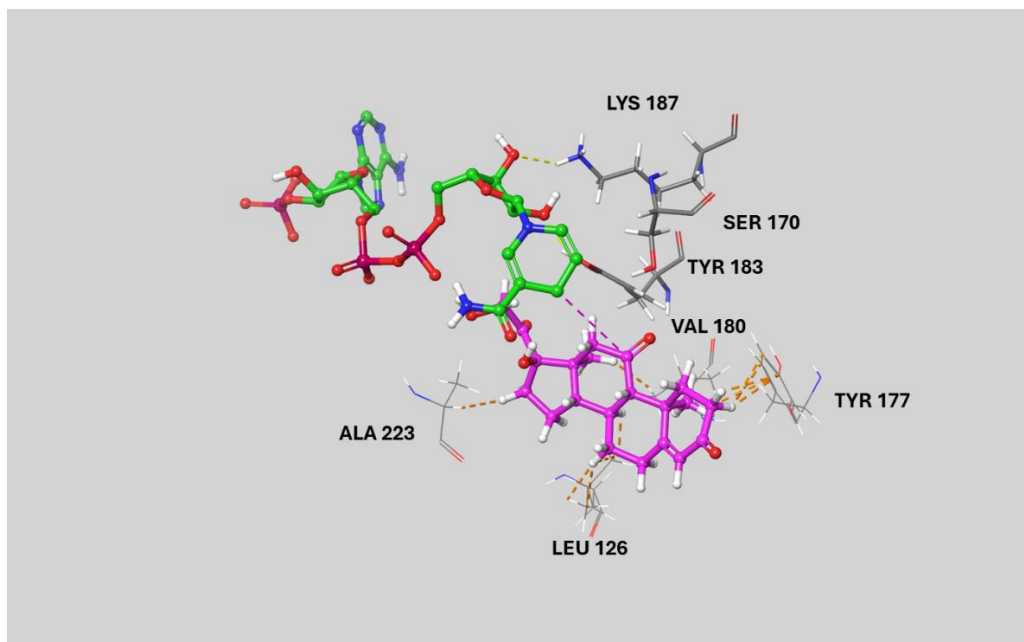


Figura 17 Disposición en el espacio de los residuos de Ser 170, Tyr 183 y Lys 187 como triada catalítica e interacción entre el NADPH (verde) y la cortisona (morado).

Paralelamente, la Figura 18 muestra el diagrama 2D de las interacciones de la cortisona, principal sustrato de la 11 β -HSD1 en su actividad reductasa, se pueden destacar las interacciones hidrofóbicas en gran parte de la molécula con residuos de ILE, ALA, MET, TYR, VAL, LEU y PRO. La alta presencia de residuos de aminoácidos con cadena hidrofóbica indica la naturaleza del *pocket* y la capacidad de la estructura esteroidea de la cortisona para ingresar al mismo. No obstante, también interacciones polares son importantes para el acoplamiento del sustrato, destacando SER 184, THR 220, THR 222, THR 124, SER 125, SER 229 y el residuo del sitio catalítico SER 170, estas interacciones se pueden deber a la presencia de grupos hidroxilo en el carbono 17 y 19, además de la cetona en 18. El residuo de LYS 225 junto con la lisina catalítica 187 poseen interacciones de carga positiva con el sustrato.

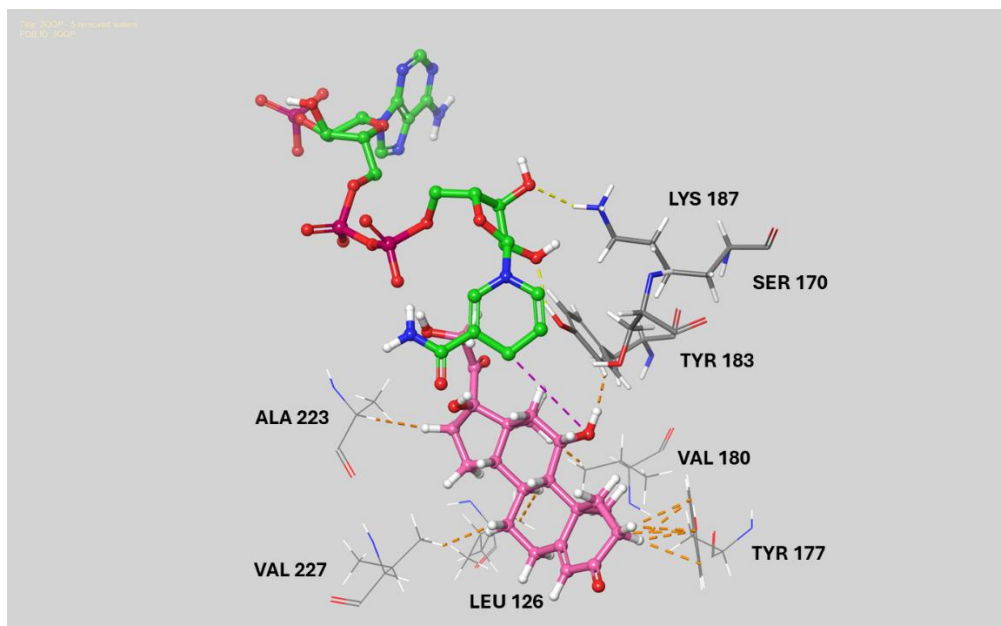


Figura 19 Disposición en el espacio del cortisol (rosa) en el bolsillo catalítico, mostrando los residuos de aminoácidos con los que interacciona además del centro catalítico y el cofactor NADPH (verde).

Paralelamente, en términos de residuos de interacción podemos observar que el cortisol presenta un carácter hidrofóbico predominante en la molécula con algunas regiones polares e interacciones con residuos cargados positivamente (Figura 20). En contraste con la cortisona, los residuos de interacción hidrofóbica se conservan entre ambas moléculas, al igual que las interacciones polares y las dos lisinas que interaccionan por carga positiva, no obstante, al cortisol se le suma una interacción de glicina mediante el residuo GLY 173 a comparación de la cortisona.

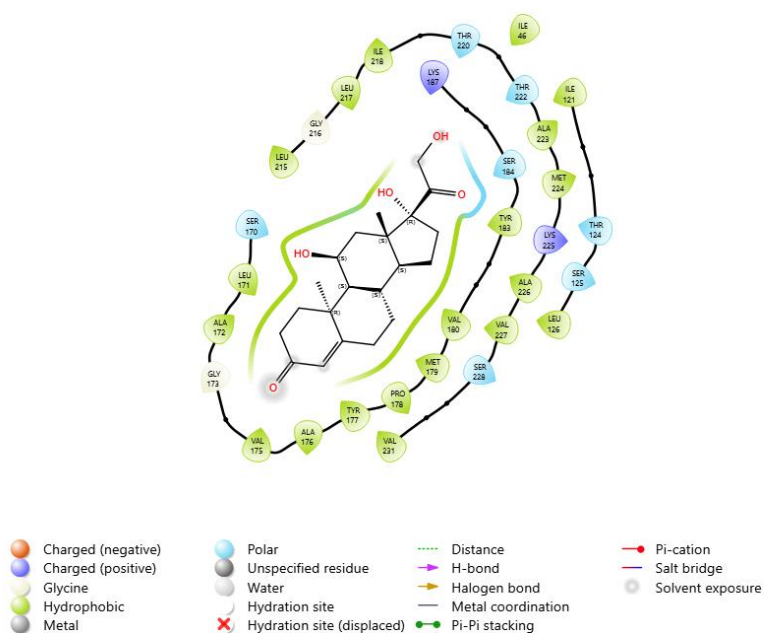


Figura 20 Diagrama 2D de interacciones del cortisol en el cristal 3QQP

Finalmente, procediendo con el inhibidor de referencia dual seleccionado como modelo de estudio, la carbenoxolona, se encontró para esta isoforma en el estado de NADPH un docking score de -8.559 kcal/mol, explicando así un acoplamiento superior al sustrato endógeno de este estado de la isoforma 1, el inhibidor se acopla al mismo sitio que los sustratos endógenos, en el diagrama 3D (Figura 21) se pueden observar los aminoácidos de interacción en el bolsillo catalítico, compartiendo los residuos de ALA 223, LEU 126, TYR 177 y VAL 180 con la cortisona. No obstante, la carbenoxolona posee interacciones adicionales como LEU 217, LEU 171, THR 124 e ILE 121 lo que podría contribuir a su actividad inhibitoria hacia la 11 β -HSD1, al mantener un acoplamiento más estable que la cortisona.

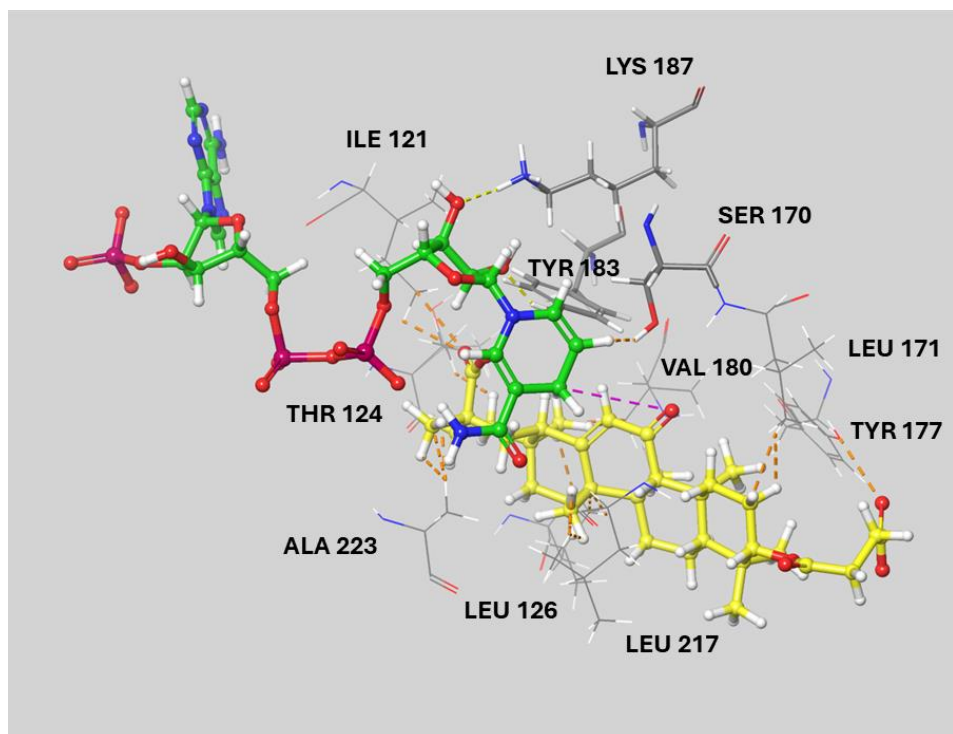


Figura 21 Docking molecular de la carbenoxolona con la 11 β -HSD1 de cristal 3QQP

En cuanto al diagrama de interacción en dos dimensiones de la carbenoxolona (Figura 22) podemos observar que predominan las interacciones de carácter hidrofóbico con 20 residuos, 13 residuos interacciones polares, de carga positiva 2 residuos, y a diferencia de los sustratos endogenos, la carbenoxolona tiene interacciones con residuos cargados negativamente tales como ASP 259 y GLU 221. Asi mismo este inhibidor interacciona con los residuos de la triada catalítica de la 11 β -HSD1.

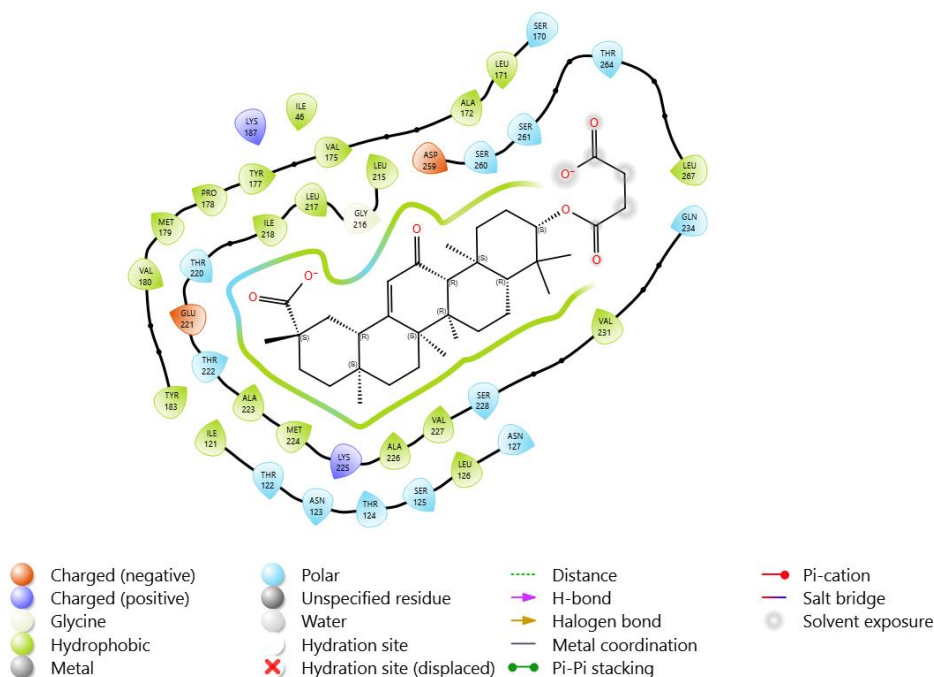


Figura 22 Diagrama 2D de interacciones de la carbenoxolona con la 11β-HSD1 3QQP

4.2 Docking molecular de sustratos e inhibidor de la 11β-HSD1 con el cristal 2BEL

En este trabajo se estudió la 11β-HSD1 en la dirección de oxidación del cortisol en cortisona, se empleó el cristal de código de pdb 2BEL como modelo ya que este se encuentra cristalizado con NADP⁺, este cofactor direcciona la actividad catalítica de la enzima, lo que se ve reflejado en el docking score para el cortisol y la cortisona de -8.253 y -6.981 kcal/mol, respectivamente. En la Figura 23a se observa el docking de la enzima mostrada en una representación de listones, el cofactor NADP se muestra de color morado y el anillo piridínico se encuentra cercano a los sustratos endógenos. La cortisona (rosa) y el cortisol (gris) se encuentran superpuestos en la misma región de la proteína, a pesar de esto no presentan una pose similar a la que se pudo observar en el docking con el cristal 3QQP en la dirección de reducción del glucocorticoide, adicionalmente la distancia entre el hidruro y los oxígenos unidos al carbono 11 de ambos glucocorticoides es menor a la obtenida en el docking con 3QQP.

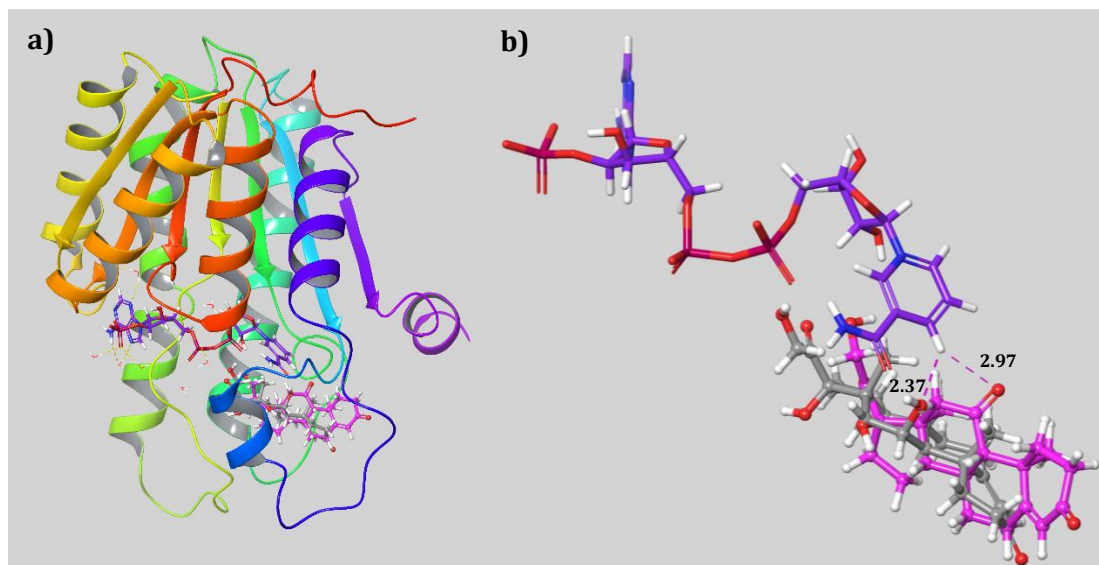


Figura 23 Docking molecular de la 11β-HSD1 de cristal 2BEL con sus sustratos endógenos. A) Representación de la proteína como listones. B) Acercamiento al acoplamiento de los sustratos, la cortisona (rosa) y el cortisol (gris) se encuentran superpuestos con distintas poses.

En la Figura 24 se observan las interacciones del cortisol (gris) en el docking con los residuos de aminoácidos en el sitio de unión, residuos como THR 222, LEU 217, ALA 223 y VAL 180 estabilizan el acoplamiento del sustrato a la enzima, estos últimos dos también se encuentran en los resultados del docking con 3QQP para la cortisona siendo así residuos importantes en la interacción adecuada enzima-sustrato para ambas direcciones de la 11β-HSD1. Adicionalmente los hidrógenos del anillo D y del metilo del carbono trece del cortisol, interaccionan con el anillo aromático de la TYR 183. Además de interaccionar con el sustrato, THR 222 tiene interacción con el NADP, y considerando que la unión del cofactor ocurre antes que el sustrato, este residuo y la presencia de NADP en lugar de NADPH podrían conllevar a la dirección de la 11βHSD1 como oxidante del cortisol.

Por otro lado, en el diagrama 2D de interacciones del cortisol con la 11β-HSD1 de cristal 2BEL (Figura 25), se observa que las interacciones hidrofóbicas seguidas por las interacciones polares, con 20 y 9 residuos de aminoácidos respectivamente. También podemos destacar la interacción de carga positiva con LYS 187, solo en esta dirección una interacción de carga negativa con el residuo GLU 221 y finalmente dos interacciones de tipo glicina con GLY 45 y GLY 216.

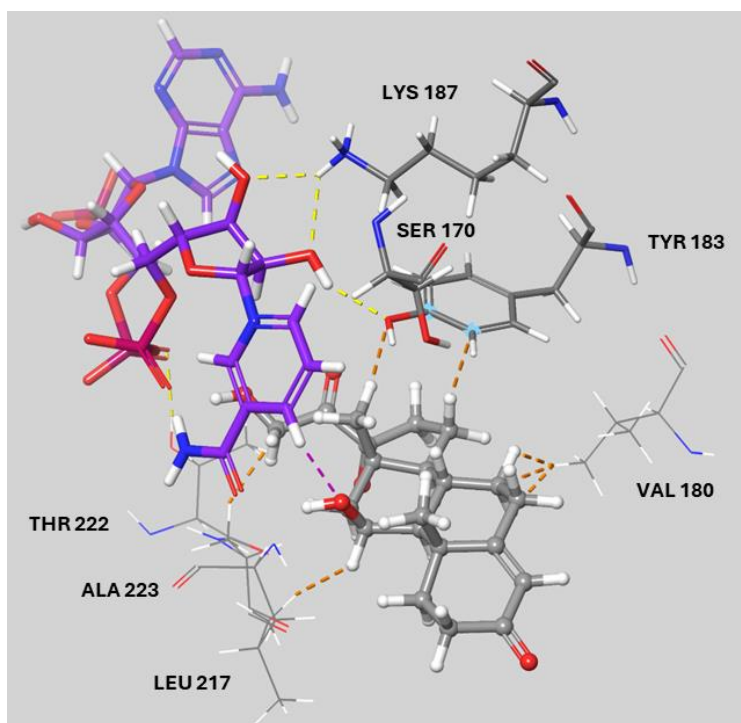


Figura 24 Interacción del cortisol en gris con residuos del bolsillo catalítico en el cristal 2BEL de la 11β-HSD1

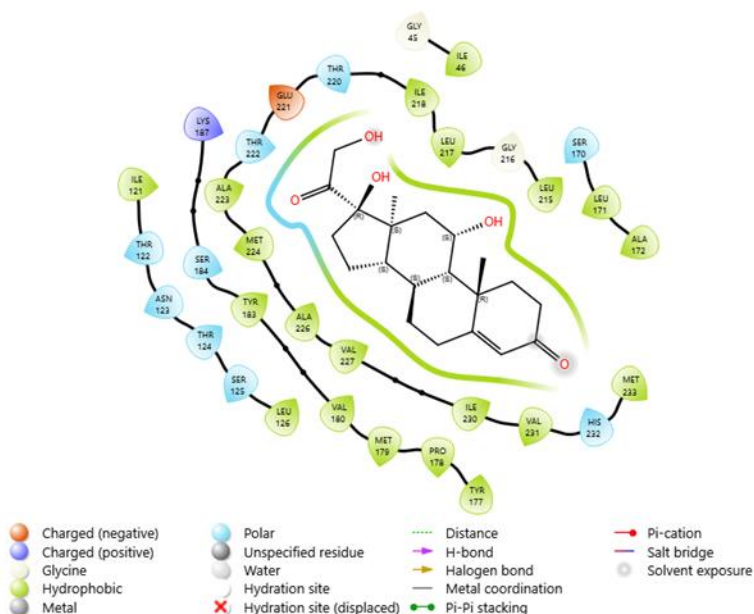


Figura 25 Diagrama 2D de interacciones entre el cortisol y la 11β-HSD1 2BEL.

La cortisona tuvo dos interacciones en el bolsillo catalítico (Figura 26) a comparación de cinco del cortisol, esto puede explicar a su vez su menor docking score, también la distancia entre el oxígeno del carbono 11 y el hidruro del anillo piridínico del NADP fue mayor que la del cortisol. Aunado a esto, en el diagrama de dos dimensiones (Figura 27) se observan 22

residuos con interacción hidrofóbica y 7 con interacción polar, además de un puente de hidrógeno con la tirosina catalítica 183 y una interacción de carga positiva con LYS 187.

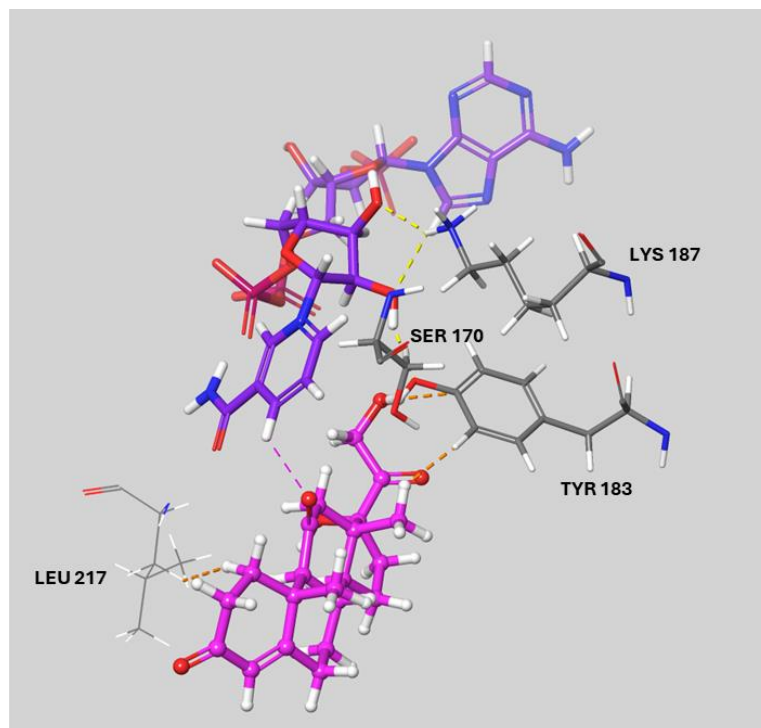


Figura 26 Interacción de la cortisona en rosa con residuos del bolsillo catalítico en el cristal 2BEL de la 11β-HSD1

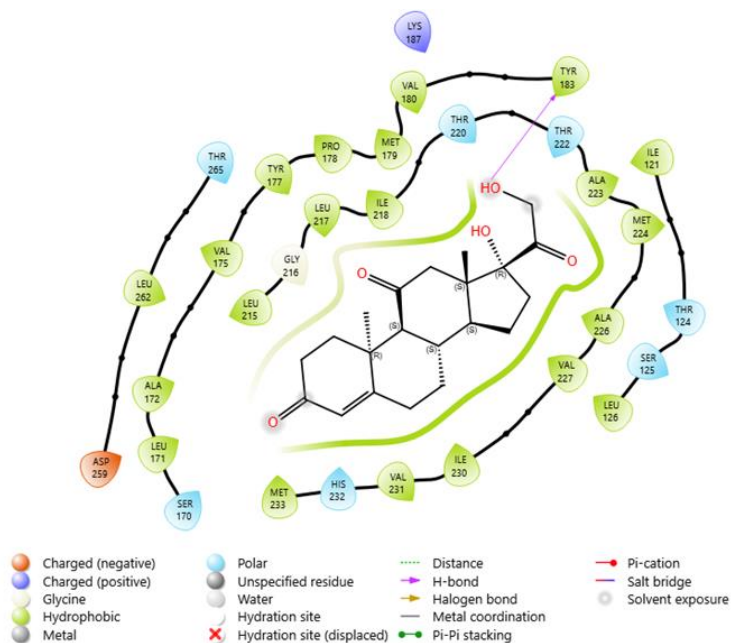


Figura 27 Diagrama 2D de interacciones de la cortisona con 11β-HSD1 2BEL

La carbenoxolona se acopló en el sitio activo de la enzima 11β-HSD1 en dirección de oxidasa (Figura 28) puesto que se encuentra en los mismos confines que los sustratos endógenos. El

docking score fue de -9.382, mayor que en la dirección de reductasa lo que sugiere que la carbenoxolona actúa como inhibidor dual en ambas direcciones con una inclinación hacia la forma de oxidasa. Aunado a esto, se presentan las interacciones del acoplamiento de la carbenoxolona (verde) en el bolsillo catalítico de la 11 β -HSD1 de cristal 2BEL, se destaca la interacción con VAL 180 la cual también se encuentra presente en ambos sustratos, interacciones con residuos más lejanos como ALA 226, VAL 227 y MET 233 se deben al tamaño de la molécula por lo que bloquea la entrada de los sustratos, esto también se puede observar en el diagrama 2D de interacciones de la carbenoxolona (Figura 29), donde gran parte de la cadena lateral del terpenoide se encuentra expuesta al solvente. A su vez la carbenoxolona presenta más regiones polares en la molécula en comparación a la cortisona y cortisol, establece interacciones hidrofóbicas con 21, polares con 9 y 2 interacciones con glicinas.

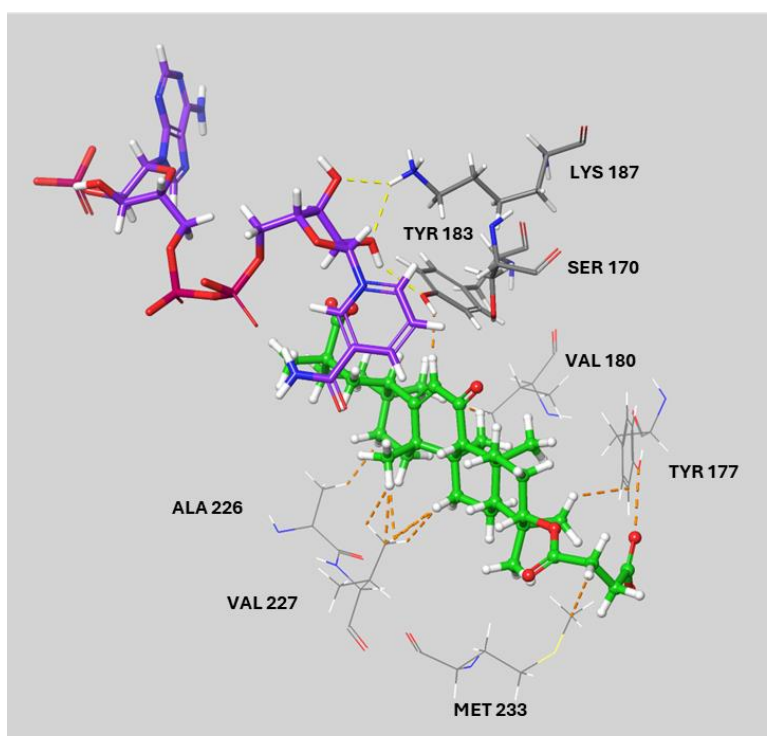


Figura 28 Acoplamiento e interacciones de la carbenoxolona con la 11 β -HSD1 2BEL

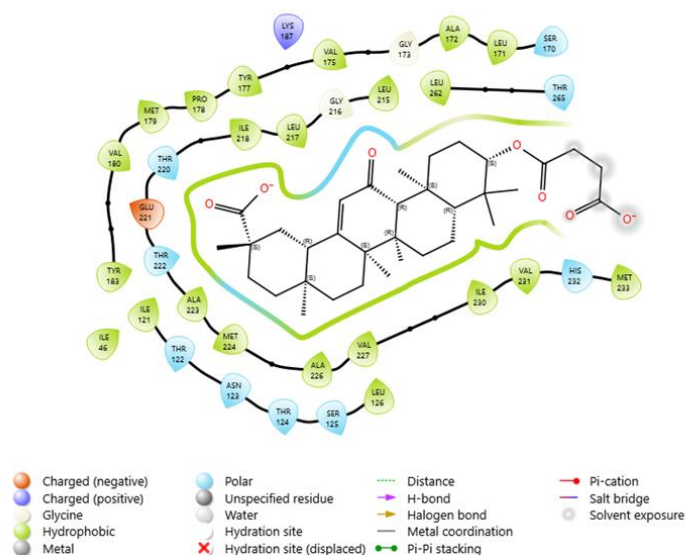


Figura 29 Diagrama de interacciones 2D de la carbenoxolona con la 11β-HSD1 2BEL.

4.3 Docking molecular de sustrato e inhibidor de la 11β-HSD2

La 11β-HSD2 no cuenta actualmente con un cristal registrado por lo que su estudio bioinformático puede ser limitado. En este trabajo se realizó el modelado por homología mediante modelado por Alphafold, a la enzima obtenida se le hizo docking molecular con su sustrato endógeno cortisol, la cortisona y el inhibidor no específico carbenoxolona. La Figura 30 muestra el resultado del acoplamiento del cortisol (rosa), cortisona (amarillo) y la carbenoxolona (azul), estos obtuvieron un docking score de -7.173, -7.073 y -8.248 kcal/mol respectivamente, lo que coincide con la selectividad de la 11β-HSD2 por el cortisol y la capacidad de la carbenoxolona de inhibir la isoforma 2. Además, las tres moléculas se acoplaron en el mismo sitio.

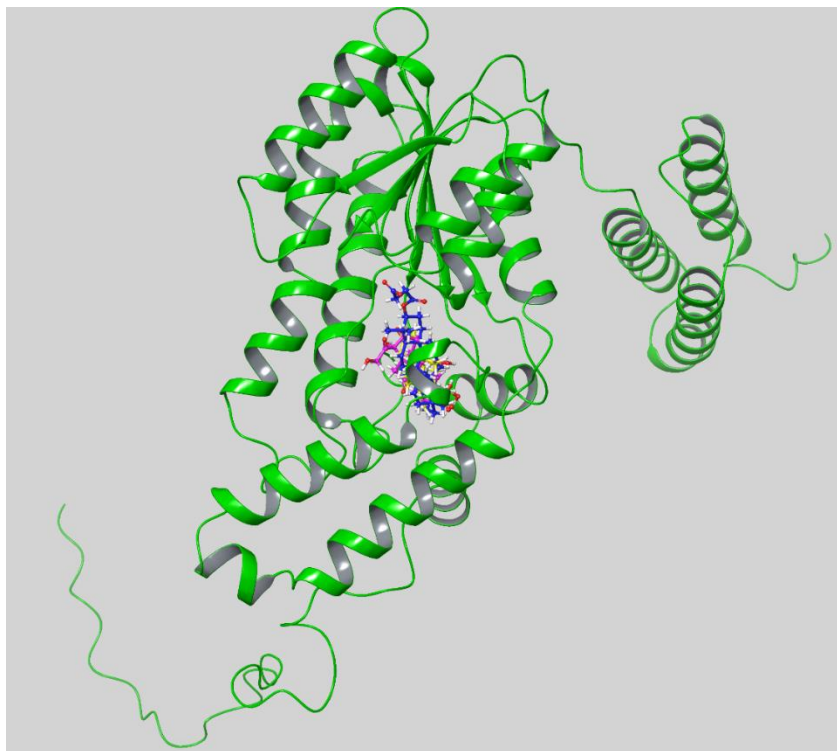


Figura 30 Docking molecular de la 11β-HSD2 modelada por AlphaFold con cortisol (rosa), cortisona (amarillo) y carbenoxolona (azul)

El cortisol, sustrato endógeno de la isoenzima 2, se muestra de color rosa acoplado al modelo de la 11β-HSD2 (Figura 31), estableciendo interacciones con residuos como CYS 264, GLY 263, TYR 226, PRO 220 y LEU 229 para poder obtener una conformación adecuada en el sitio catalítico, que a su vez interacciona con la SER 219, que junto a LYS 236 y TYR 232 se representan de color gris y con palos gruesos en la figura para representar la triada catalítica, la manera en la que están dispuestos es similar a los acoplamientos con la isoforma 1 a pesar de no contar con el cofactor para este docking. La distancia entre el hidroxilo de la tirosina catalítica y el carbono del alcohol en la posición 11 del cortisol fue de 3.47 Å.

De forma paralela, las interacciones en el diagrama 2D (Figura 32) del cortisol muestran que esta molécula tiene en su mayoría regiones hidrofóbicas, sin embargo, las regiones polares son mayores que en la de los sustratos endógenos en la 11β-HSD1. El sustrato interacciona con 21 residuos de manera hidrofóbica y 8 con carácter polar, establece un mayor número de interacciones con glicinas comparado con el cortisol y cortisona, con la GLY 263 y TYR 226 forma puentes de hidrógeno. Adicionalmente, los tres residuos del centro catalítico se encuentran en el diagrama de interacción con LYS 236 interactuando con carga positiva, SER 219 de manera polar y TYR 232 de forma hidrofóbica.

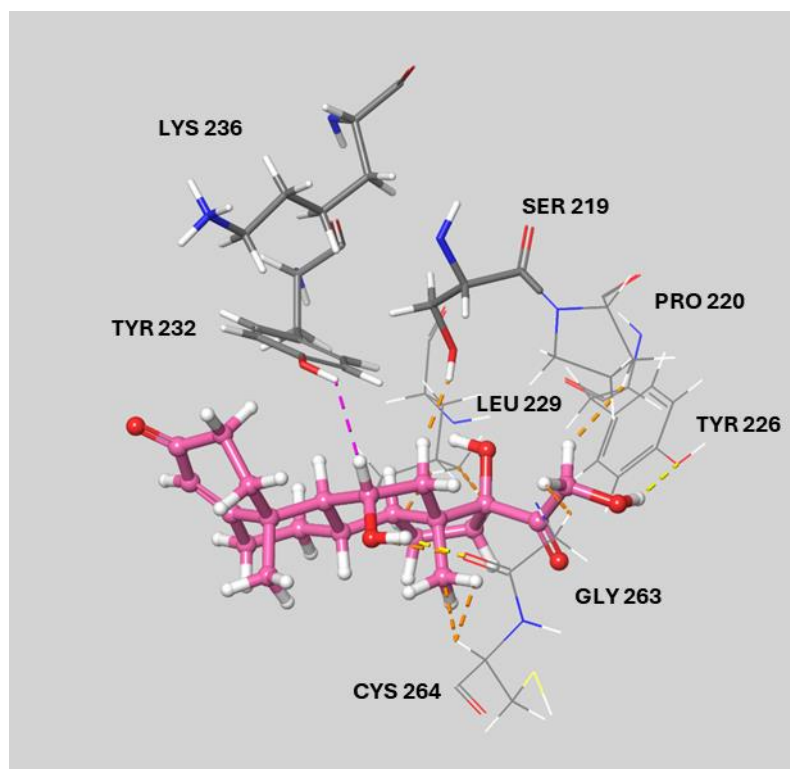


Figura 31 Disposición espacial del acoplamiento del cortisol en el modelo de la 11 β -HSD2

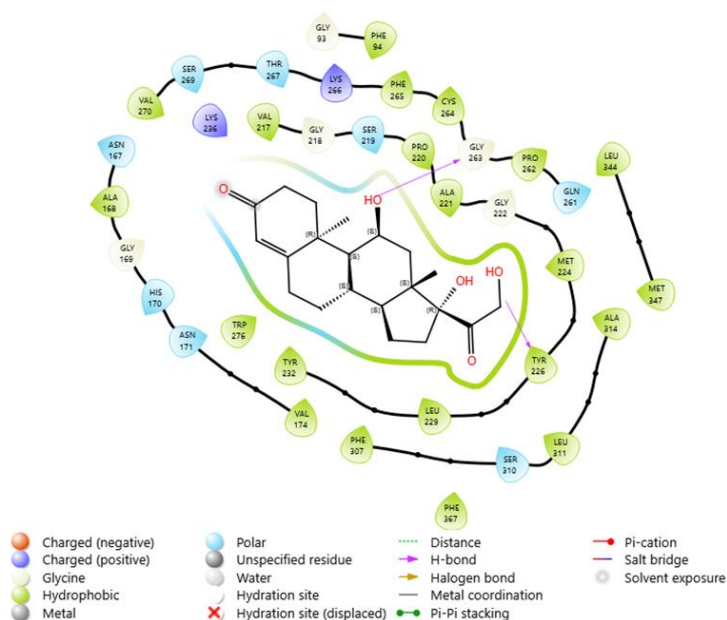


Figura 32 Diagrama 2D de interacciones del cortisol con la 11 β -HSD2 modelada por Alphafold

Aunque no es sustrato de esta enzima, se realizó el acoplamiento de la 11 β -HSD2 con la cortisona, en la Figura 33 se observa el docking molecular realizado con el modelo generado por Alphafold, la cortisona interactúa con menos residuos en comparación con el cortisol siendo estos ASN 171 y SER 269, además de compartir interacciones como GLY 263 y la

tirosina catalítica 232. No obstante, la distancia entre el C11 de la cortisona y el hidroxilo de la cadena lateral de la tirosina fue mayor a la del cortisol, con 4.14 Å. En cuanto al diagrama de interacciones en dos dimensiones (Figura 34), se destaca que en el acoplamiento de la cortisona esta presenta regiones hidrofóbicas, interaccionando con 20 residuos, y polares, con 8 residuos, principalmente pero también posee regiones de interacción con glicinas como GLY 93, 218, 169 y 263. También se presentan puentes de hidrógeno con TYR 232, ASN 171 y SER 269.

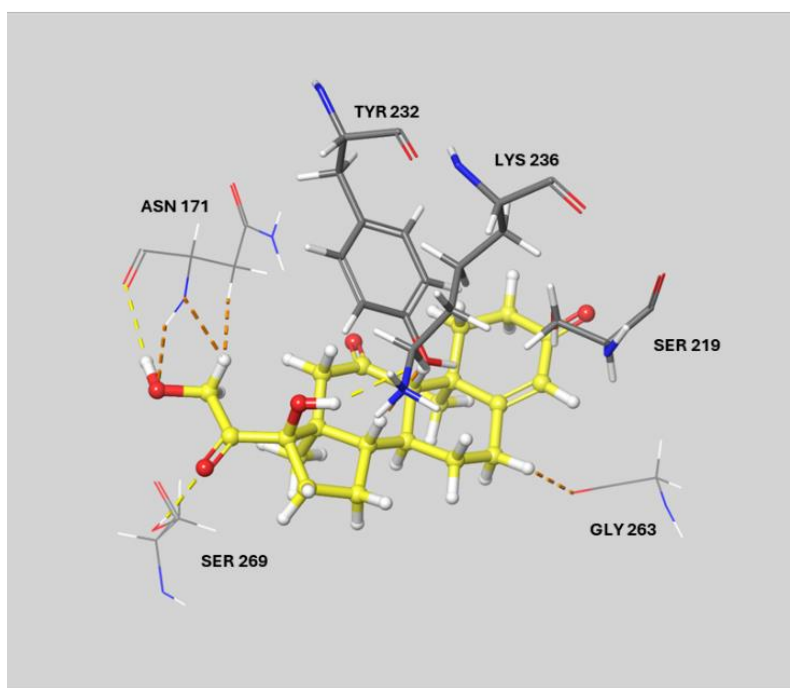


Figura 33 Disposición espacial del acoplamiento de la cortisona en el modelo de la 11β-HSD2

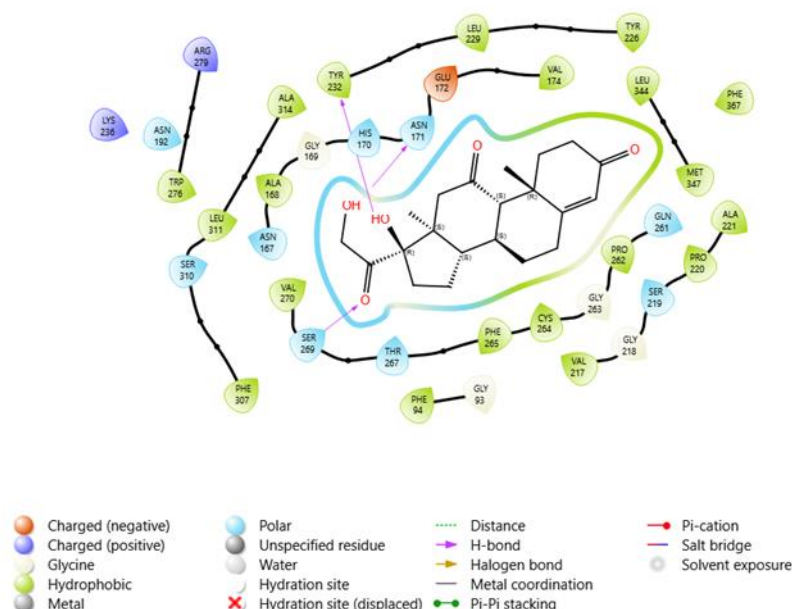


Figura 34 Diagrama 2D de interacciones de la cortisona con la 11β-HSD2 modelada por AlphaFold

En cuanto al acoplamiento de la carbenoxolona (Figura 35), esta interaccionó con más residuos en el bolsillo catalítico comparado con el cortisol y la cortisona, coincidiendo con el primero en la TYR 226, GLY 263 y CYS 264. Además de interacciones con residuos lejanos al sitio catalítico como GLY 89, SER 92, ALA 128 y GLY 169 que interaccionan con el anillo D y la cadena lateral de la carbenoxolona, THR 267, LYS 236 y ALA 221 también son exclusivos del inhibidor. Adicionalmente, el residuo de la triada catalítica TYR 232 interacciona con la carbenoxolona a diferencia del cortisol, lo que puede formar parte del mecanismo por el cual este inhibe a la 11β-HSD2. Por lo que se refiere al diagrama de interacciones 2D (Figura 36), la carbenoxolona presenta en su mayoría una región hidrofóbica con la que interacciona con 28 residuos de aminoácidos, también podemos encontrar regiones polares en la molécula que interaccionan con 9 residuos, regiones de interacción de glicina que interactúan con 8 de estos residuos, de igual forma se pueden mencionar interacciones con cuatro y dos residuos cargados positiva y negativamente, de manera respectiva. A diferencia del sustrato endógeno, la carbenoxolona establece puentes de hidrogeno con SER 93 y GLY 169 por lo que dichas interacciones pueden ser clave para la estabilidad de acoplamiento y eventual inhibición de la 11β-HSD2.

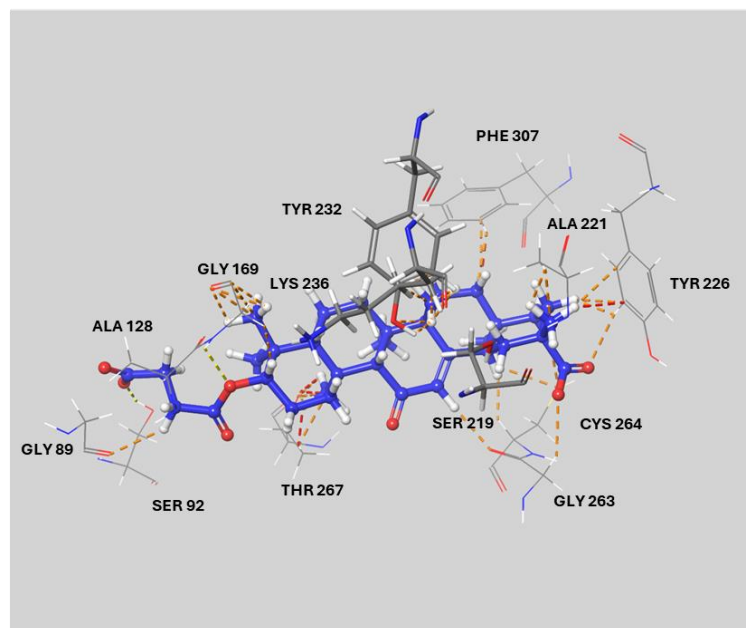


Figura 35 Disposición espacial del acoplamiento de la carbenoxolona en el modelo de la 11β-HSD2

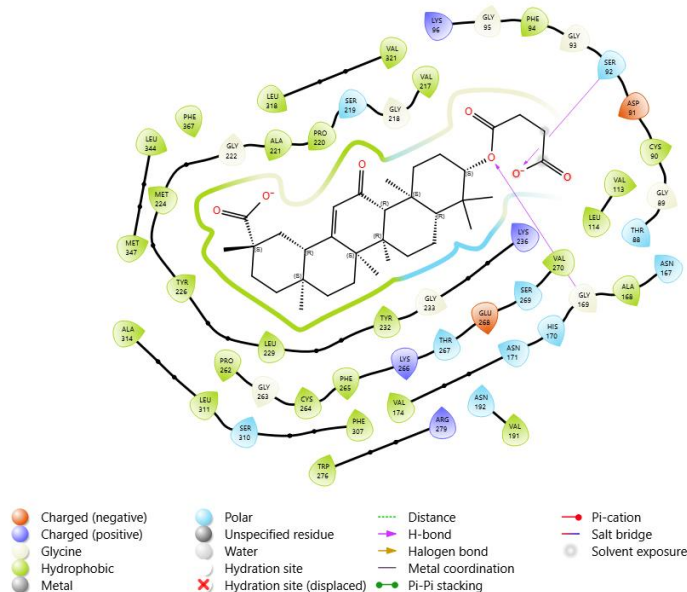


Figura 36 Diagrama 2D de interacciones de la carbenoxolona con la 11β-HSD2 modelada por AlphaFold

4.4 Dinámica molecular de la 11β-HSD1 cristal 2BEL con el inhibidor no selectivo: carbenoxolona

Los resultados de la dinámica molecular en la enzima 11β-HSD1 en su forma de oxidasa con el inhibidor no específico carbenoxolona se muestran a continuación. En primera instancia la desviación cuadrática media (RMSD) mide el cambio promedio del desplazamiento de una selección de átomos en un marco o cuadro con respecto a otro de referencia, en el caso de la proteína 2BEL el RMSD varía entre 1.6 Å y 2 Å después de que el esqueleto proteico se estabilizara tras los 20 nanosegundos (en verde en la Figura 37). Así mismo, la cadena lateral

varía entre 2.8 Å y 3 Å debido a la libertad de movimiento de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos. En el caso de la carbenoxolona le toma alrededor de 30 nanosegundos en alinearse con la proteína para posteriormente alinearse con una RMSD similar a la de la cadena lateral, sugiriendo que la estabilidad del complejo enzima-ligando es estable durante el tiempo simulado.

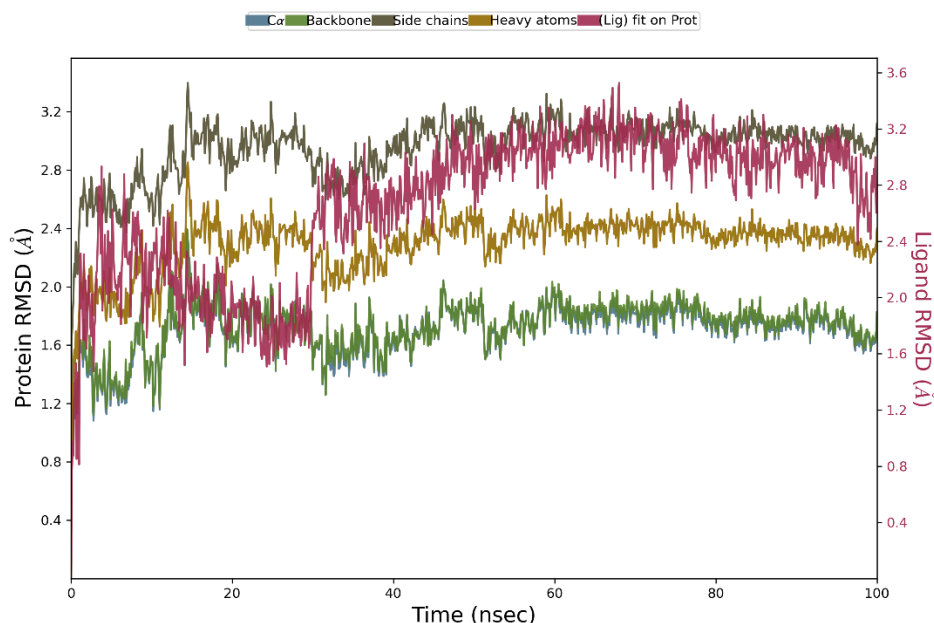


Figura 37 Desviación cuadrática media (RMSD) de la proteína 2BEL y del ligando

La fluctuación cuadrática media (RMSF) permite caracterizar cambios locales a lo largo de la cadena proteica, comúnmente los extremos N- y C- terminal de las proteínas tienden a fluctuar al no contener estructuras rígidas mientras que hélices alfa y láminas beta fluctúan menos en consecuencia. En la Figura 38 se muestran los resultados de RMSF para la 11 β -HSD1 2BEL, se pueden observar cuatro regiones de alta fluctuación, particularmente la región C- terminal seguida de la región compuesta por los residuos 100-125, 190~210 y 140~160. En este mismo gráfico se pueden observar en barras verdes los puntos de contacto del ligando con la enzima, los cuales coinciden con las regiones de alta RMSF.

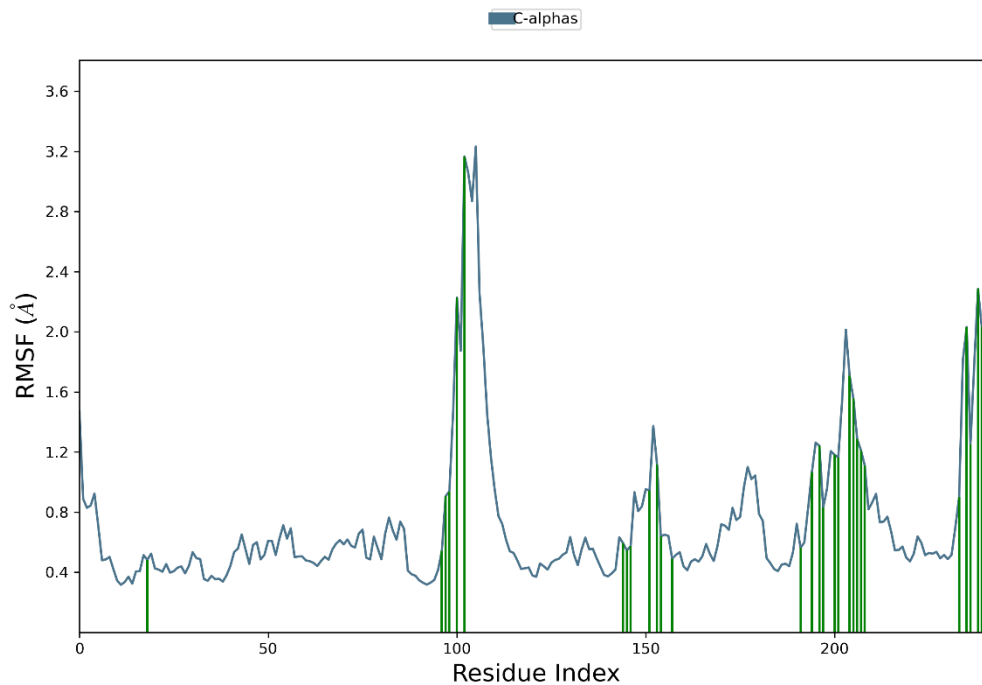


Figura 38 Fluctuación cuadrática media (RMSF) de la proteína 2BEL y los contactos con el ligando carbenoxolona

Los elementos estructurales secundarios (SSE) de la proteína como hélices alfa y láminas beta pueden monitorearse a lo largo de la simulación. La Figura 39 muestra la distribución de los SSE por residuo indexado a lo largo de la proteína, se observa que el mayor cambio conformacional en la estructura secundaria ocurre entre los residuos 100 y 200 donde existe un cambio prominente en las hélices alfa.

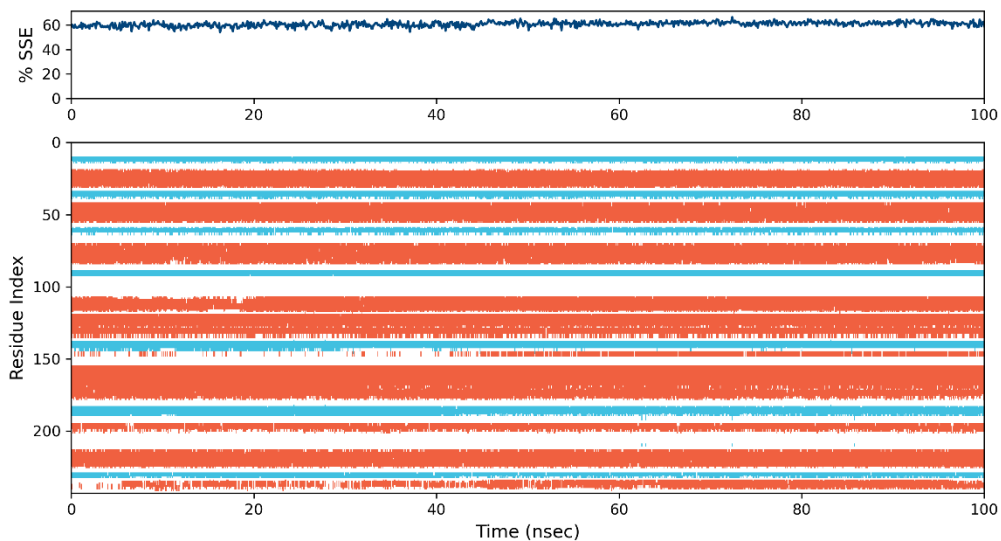


Figura 39 Cambios en los elementos de la estructura secundaria (SSE) de la proteína 2BEL

La fluctuación cuadrática media del ligando (L-RMSF) permite describir los cambios en la posición de los átomos del ligando, con base a la Figura 40, en la carbenoxolona los átomos del esqueleto triterpenoide de la carbenoxolona fluctúan poco; esto se debe a la rigidez de los anillos, mientras que los átomos situados en los sustituyentes de los anillos tienen mayor libertad para cambiar de posición a lo largo de la simulación, ejemplo son los átomos de oxígeno 36, 37, 38, 39 y 40 y los carbonos 30, 31, 32 y 33.

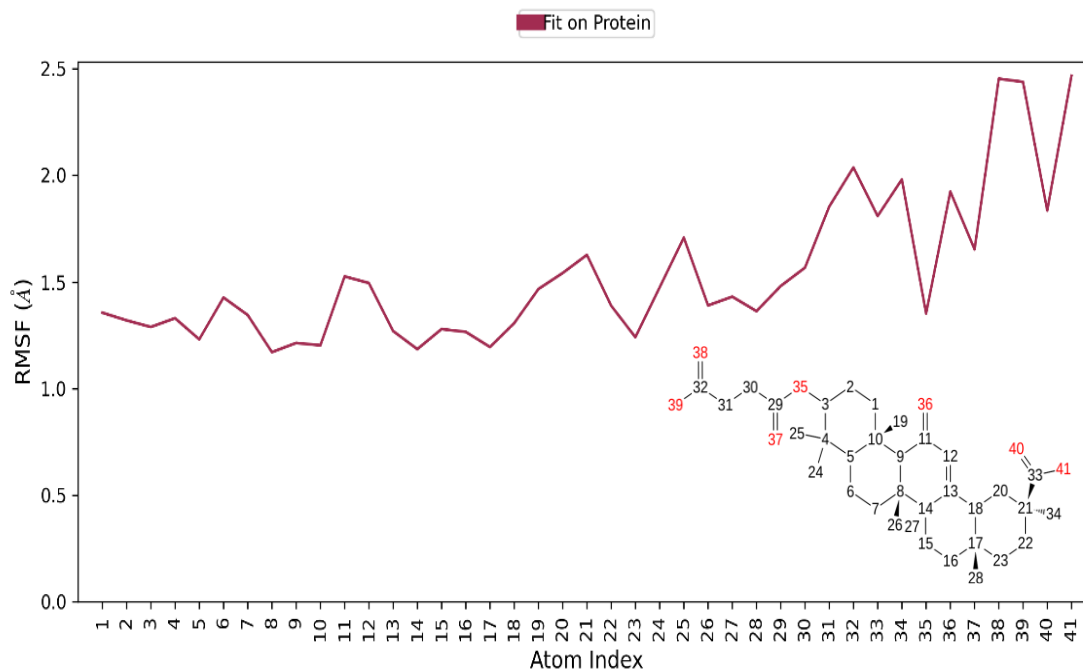


Figura 40 RMSF de la carbenoxolona en la dinámica molecular con 2BEL. Agrandar el dibujo de la carbenoxolona y que los anillos A y B estén horizontalmente

En la Figura 41 se muestran los contactos entre el ligando y la proteína 2BEL. Estas interacciones cambian a lo largo de la simulación, el histograma representa las fracciones en las que un residuo establece algún tipo de interacción con la carbenoxolona, resaltando la THR 124 que interacciona mediante puentes de agua al igual que la VAL 231 que mantiene una interacción por puentes de agua casi el 80% de las veces, pero también ocurre una interacción iónica, la MET 233 interacciona el 80% en el transcurso de la trayectoria. Adicionalmente, la TYR 177 mantiene interacciones por puentes de hidrógeno, hidrofóbicas y puentes de agua, por otro lado, la TYR 183 del centro catalítico tiene la mayor cantidad de fracciones de interacción, contando con puentes de agua e hidrógeno, hidrofóbicas e iónicas.

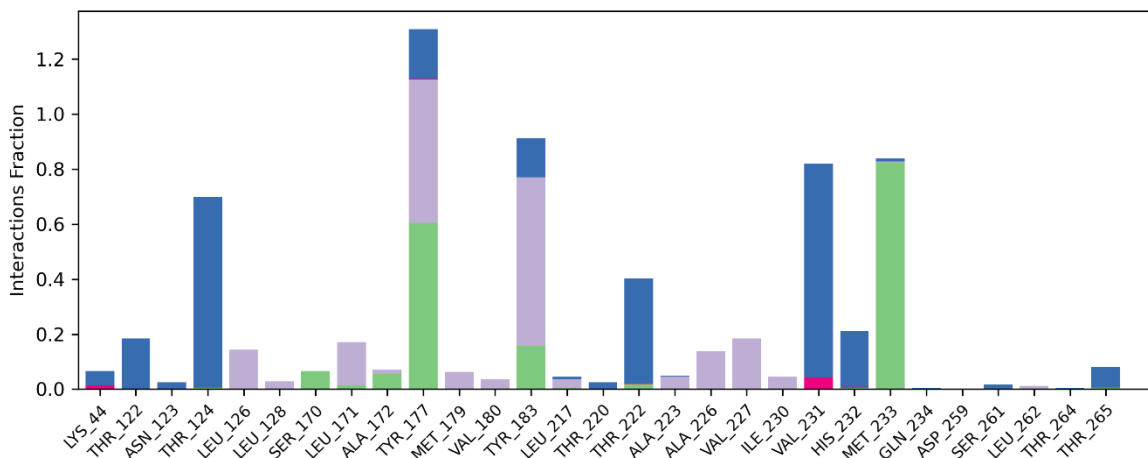


Figura 41 Histograma de contactos de la carbenoxolona con residuos de la proteína 2BEL

En concreto, los átomos del ligando que interaccionan con la proteína se muestran en la Figura 42, este diagrama representa los aminoácidos que hacen contacto por más del 10% de ocasiones durante la trayectoria seleccionada de 0 a 100 nanosegundos. Podemos destacar al residuo de MET 233 que se encuentra el 82% de las veces interaccionando con el átomo de oxígeno carbonílico que forma parte de la cadena lateral del C3, esta misma contiene un ácido carboxílico cuyos átomos de oxígeno establecen puentes de hidrógeno con VAL 231 más del 30% del tiempo. Paralelamente en el otro extremo de la molécula, el ácido carboxílico del C20 interacciona de manera polar con las treoninas 122, 124 y 222 el 15%, 20% y 30% del tiempo, respectivamente mediante puentes de agua.

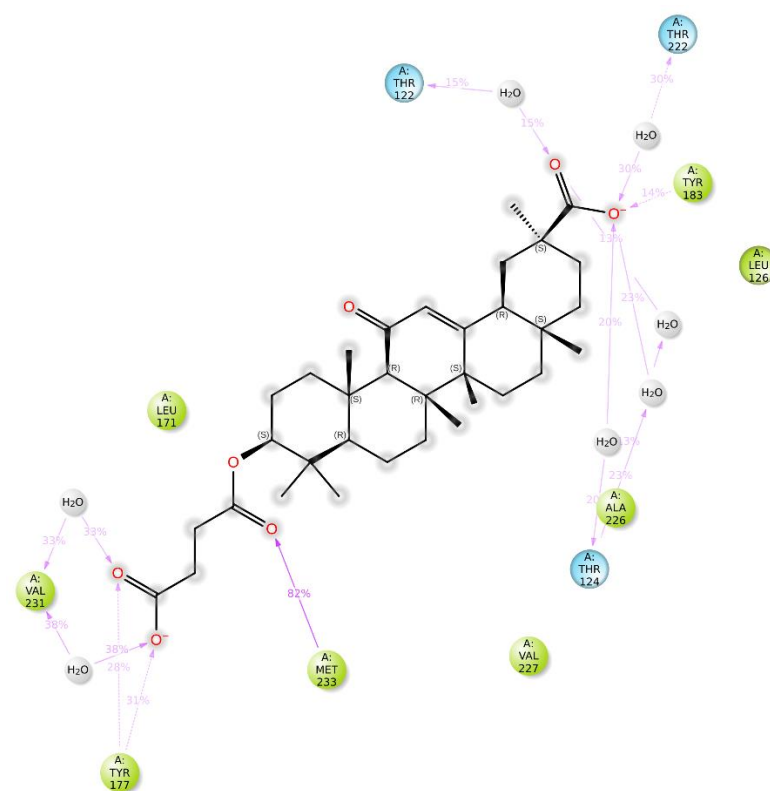


Figura 42 Diagrama 2D de contactos proteína-ligando entre los átomos de la carbenoxolona y los residuos de 2BEL

El perfil de torsión del ligando describe la evolución conformacional de cada enlace rotatorio en la molécula durante la simulación, el siguiente diagrama muestra los enlaces rotatorios de la carbenoxolona con la 11 β -HSD1 2BEL (Figura 43), cada uno está representado por un color distinto y por la naturaleza de la molécula solo los enlaces de las cadenas laterales en C3 y C20 tienen torsión, dentro de estos destacan el enlace morado que presenta una rotación prácticamente completa durante la trayectoria, del mismo modo el enlace rojo tiene libertad de rotación y varía durante la simulación, otros enlaces como el verde claro y azul carecen de movilidad y se mantienen a 180° y 90° respectivamente. Los enlaces verde y amarillo se comportan de manera similar alternando entre 90° y -90°.

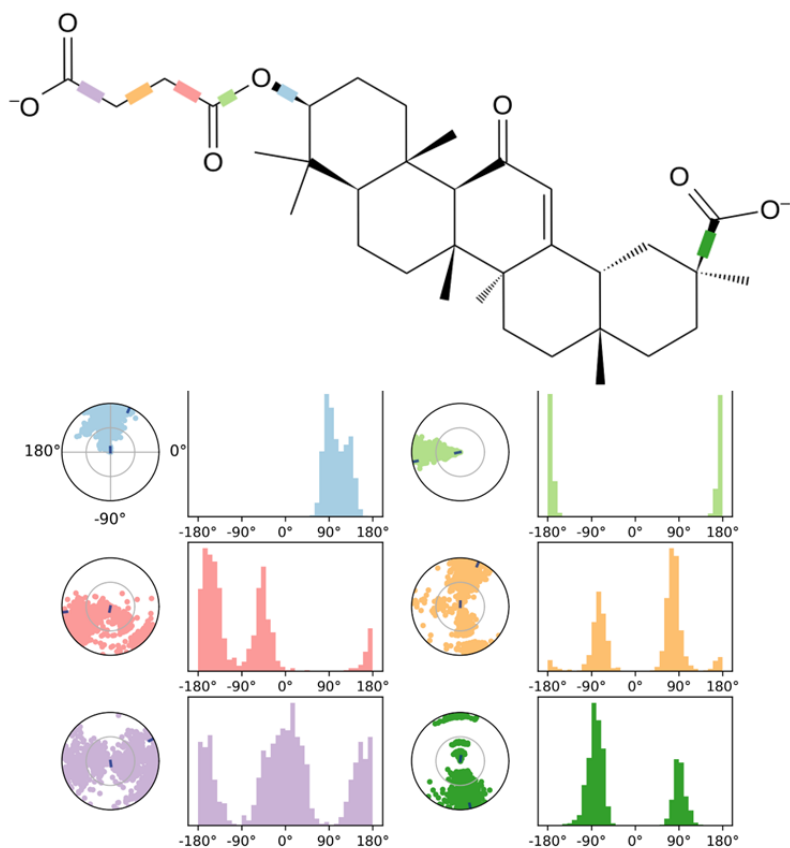


Figura 43 Perfil de torsión de la carbenoxolona en la dinámica molecular con 2BEL

4.5 Dinámica molecular de la 11 β -HSD1 cristal 3QQP con el inhibidor no selectivo: carbenoxolona

Los resultados de la dinámica molecular en la enzima 11 β -HSD1 en su forma de reductasa con el inhibidor no específico carbenoxolona se muestran a continuación. La gráfica de la RMSD de la proteína y ligando se presenta en la Figura 44, en esta se omitieron los valores de las cadenas laterales, el esqueleto y los átomos pesados de la enzima ya que no presentaban cambios destacables para presentar. En la trayectoria se puede observar que durante los primeros 35 nanosegundos los carbonos alfa y el ligando tienen un valor aproximado de 3 Å, posteriormente la RMSD aumenta para ambos criterios y al terminar la simulación el valor es de 10.5 Å y 7 Å, para los carbonos alfa y el ligando, respectivamente. Lo que indica una inestabilidad en el acoplamiento de la proteína y ligando que podría resolverse con un tiempo más amplio en la simulación.

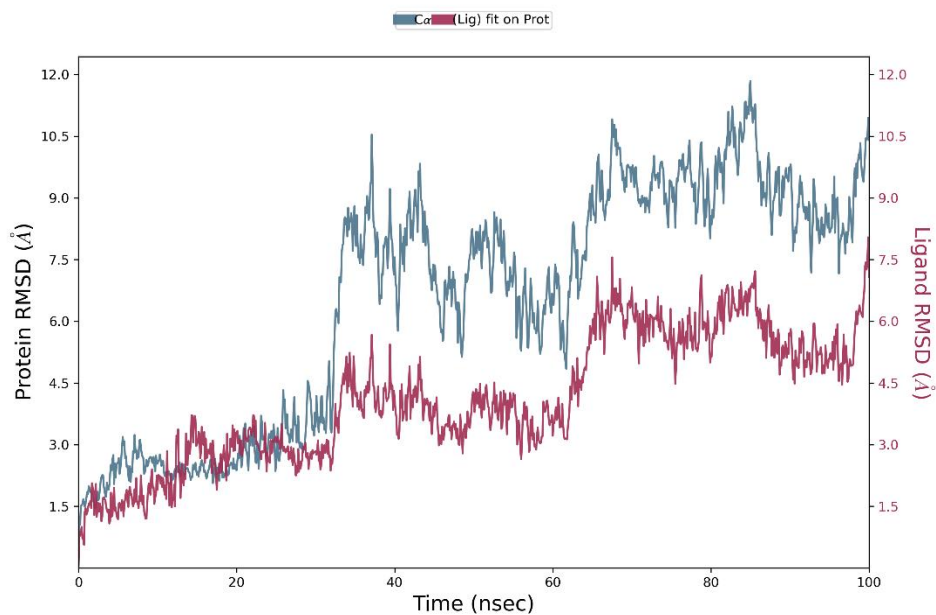


Figura 44 Grafica de la desviación cuadrática media (RMSD) de la proteína 3QQP y del ligando carbenoxolona

En particular las regiones de residuos de aminoácidos cuyos carbonos alfa más fluctúan se encuentran resumidos en la Figura 45, donde las RMSF más altas se encuentran en los intervalos aproximados de 100-110, 150-165, 190-220 y 240-260 que corresponden a su vez con los puntos de contacto con el ligando por lo que gran parte de los cambios conformacionales se le atribuye a la interacción de ambos elementos.

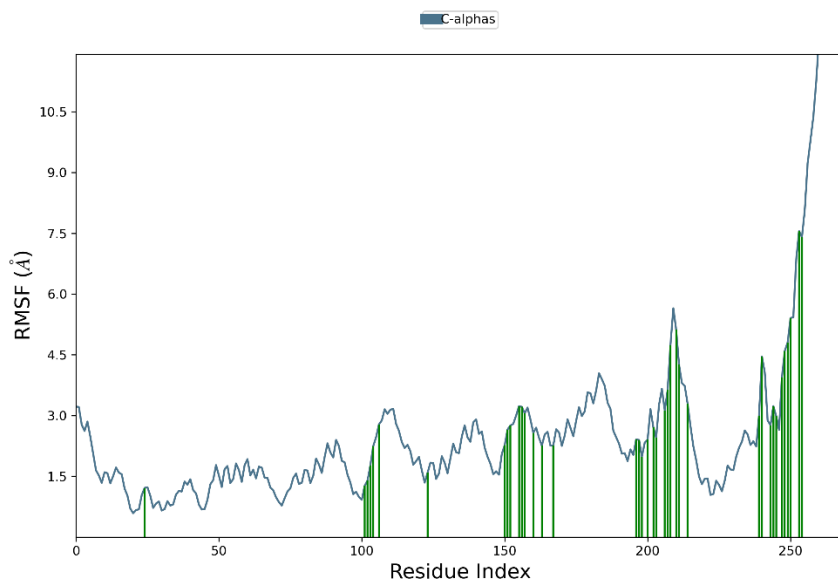


Figura 45 Grafico de la RMSF de la proteína 3QQP y los contactos con el ligando carbenoxolona

En cuanto al SSE en la simulación con la proteína 3QQP (Figura 46), los cambios en la estructura secundaria de la proteína ocurren a partir del residuo 150 y principalmente hacia el C terminal de la enzima, los cambios se presentan sobre las hélices alfa de la proteína.

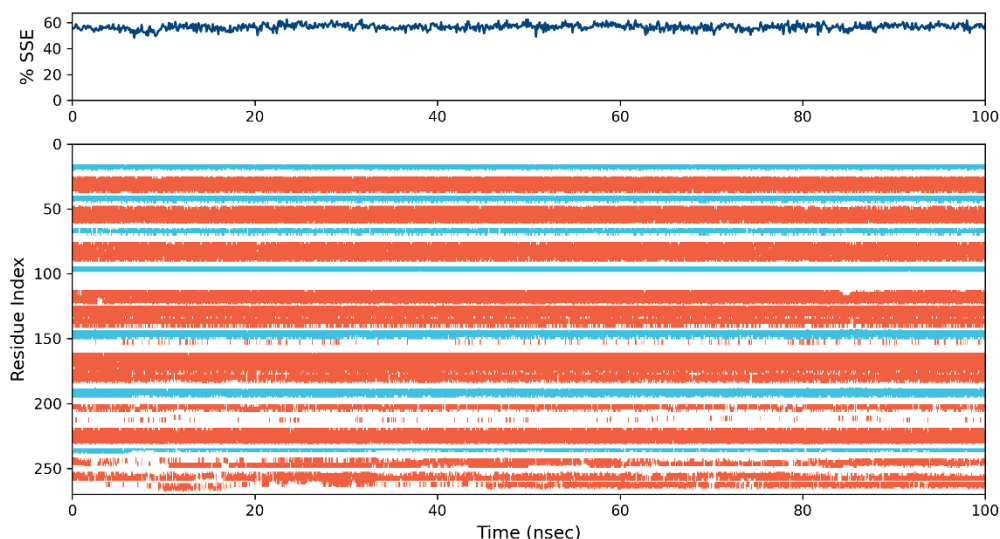


Figura 46 Cambios en los elementos de la estructura secundaria (SSE) de la proteína 3QQP

En la Figura 47 se muestra la L-RMSF de la carbenoxolona con la proteína 3QQP. Los cambios superiores a 3 Å en la posición de los átomos de la carbenoxolona son en su mayoría de oxígenos, numerados 37, 38 y 39 pero no así los oxígenos 40 y 41 cuya fluctuación se encuentra por debajo de carbonos que conforman los anillos de la molécula. Otros cambios destacables son los carbonos 24 y 25 correspondientes a metilos, y los átomos de carbono 29, 30, 31 y 32 pertenecientes a la cadena lateral del C3. En general el L-RMSF de la carbenoxolona con la 11 β -HSD1 3QQP es mayor que su contraparte 2BEL reflejando la diferencia en que este inhibidor interactúa con la proteína dependiendo de la dirección de la catálisis.

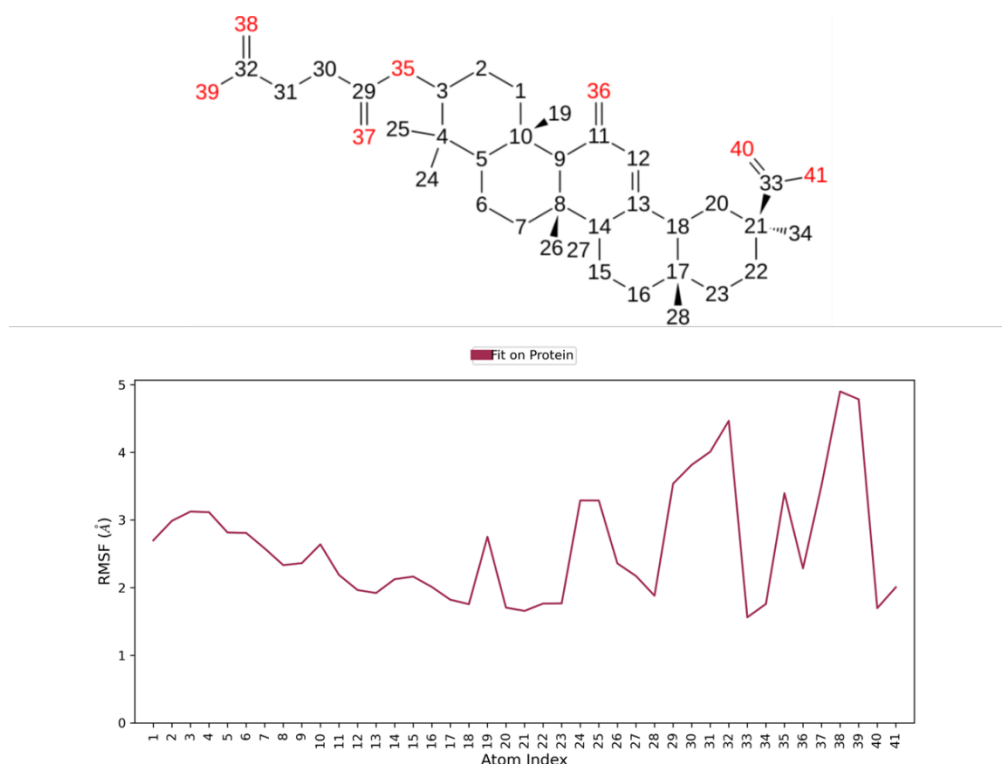


Figura 47 RMSF de la carbenoxolona en la dinámica molecular con 3QQP

Los contactos proteína-ligando más destacables son los siguientes (Figura 48), la interacción con THR 124 que sucede mayormente como iónica seguida de puentes de agua y puentes de hidrógeno, siendo este el residuo con mayor fracción de interacción luego está LEU 217 que interacciona mediante puentes de hidrógeno y ocasionalmente de manera hidrofóbica o puentes de agua. Otro contacto importante es con el residuo catalítico TYR 183 que ocurre casi completamente como puente de hidrógeno, por último, la TYR 177 hace contacto con la carbenoxolona en una fracción de 0.5 por interacción hidrofóbica. De manera complementaria, el esquema de la Figura 49 muestra los átomos de la carbenoxolona que hacen contacto con los residuos mencionados, donde LEU 217 establece un puente de hidrógeno el 65% del tiempo simulado y un 10% por puente de agua con el oxígeno carbonilo del éster en C3, la TYR 183 presenta dos contactos sobre el ligando, un 77% del tiempo entabla un puente de hidrógeno con el oxígeno de la cetona del C11 y paralelamente el 16% del tiempo con un oxígeno del ácido carboxílico del C20, esta misma región interactúa con THR 124 mediante puentes de agua y un ion de sodio.



50

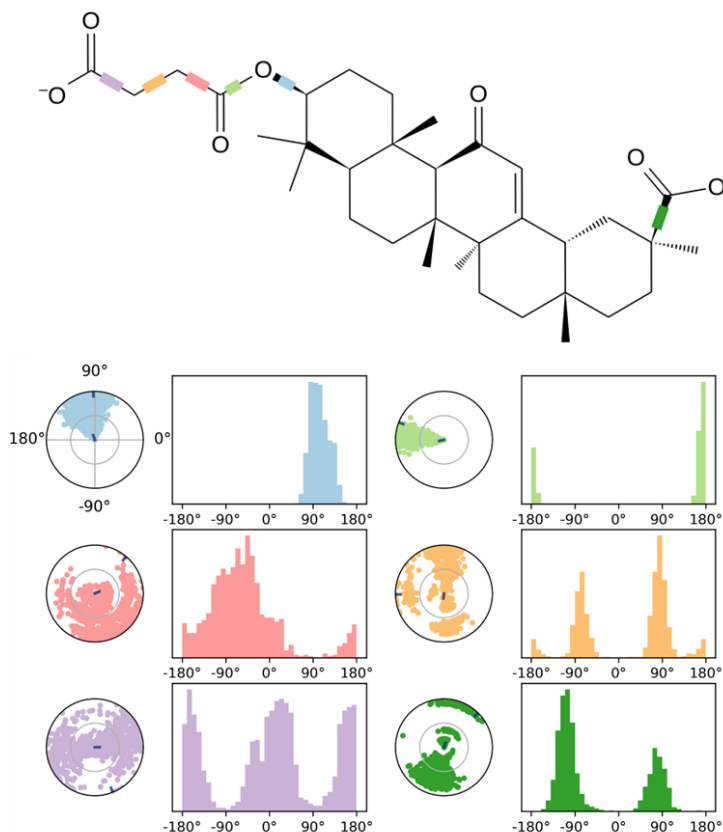


Figura 50 Perfil de torsión de la carbenoxolona en la dinámica molecular con 3QQP

4.6 Dinámica molecular de la 11 β -HSD2 modelada en Alphafold con el inhibidor no selectivo: carbenoxolona

Los resultados de la dinámica molecular para la 11 β -HSD2, modelada mediante Alphafold, y la carbenoxolona se desglosan a continuación, en el RMSD (Figura 51) de los carbonos alfa de la proteína se observa un cambio grande en el desplazamiento de los átomos de carbono que termina estabilizándose en aproximadamente 12 Å tras 100 nanosegundos, esta variación podría explicarse a la carencia de cofactor en el modelo y por ende en la simulación. Por otro lado, el ligando se mantuvo relativamente estable, presentando un RMSD de aproximadamente 3.5 Å lo que indicaría que la carbenoxolona se acopla al bolsillo de unión sin sufrir grandes cambios conformacionales.

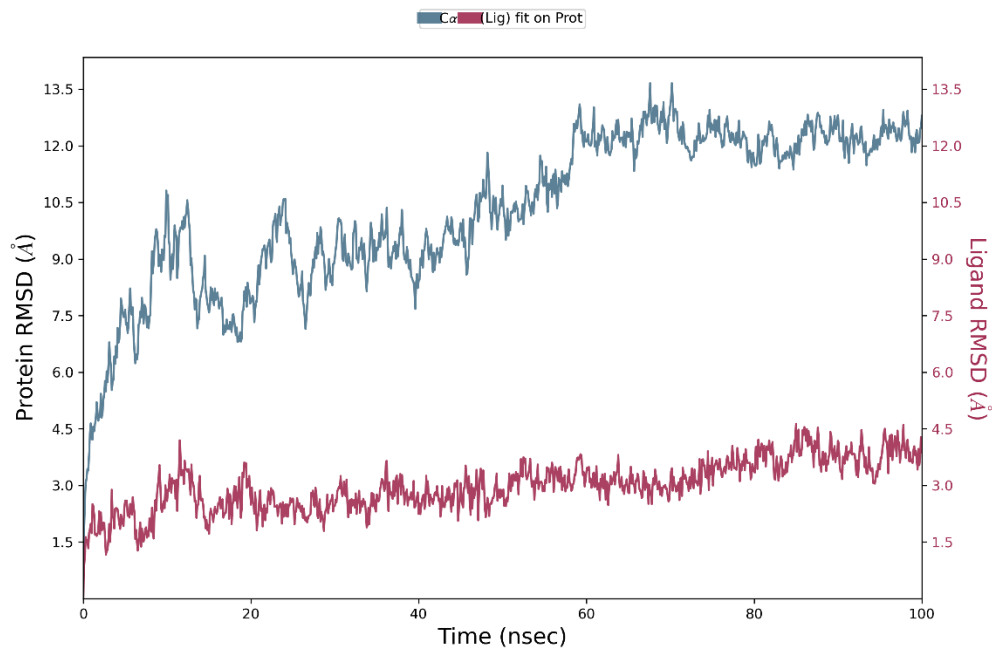


Figura 51 Grafica de la RMSD de la 11β-HSD2 modelada en Alphafold y del ligando carbenoxolona

Los cambios puntuales en los átomos de los residuos siguen un patrón esperado donde las fluctuaciones más altas se dan en los extremos terminales de la proteína, en la Figura 52 se observa que los contactos de la carbenoxolona con la proteína ocurren entre los residuos 90 y 310 aproximadamente y a diferencia de las dinámicas realizadas con las 11β-HSD1, las fluctuaciones de los carbonos alfa son iguales o menores a 3 Å por lo que se puede sugerir que la carbenoxolona se acopla de manera más estable con la isoforma 2.

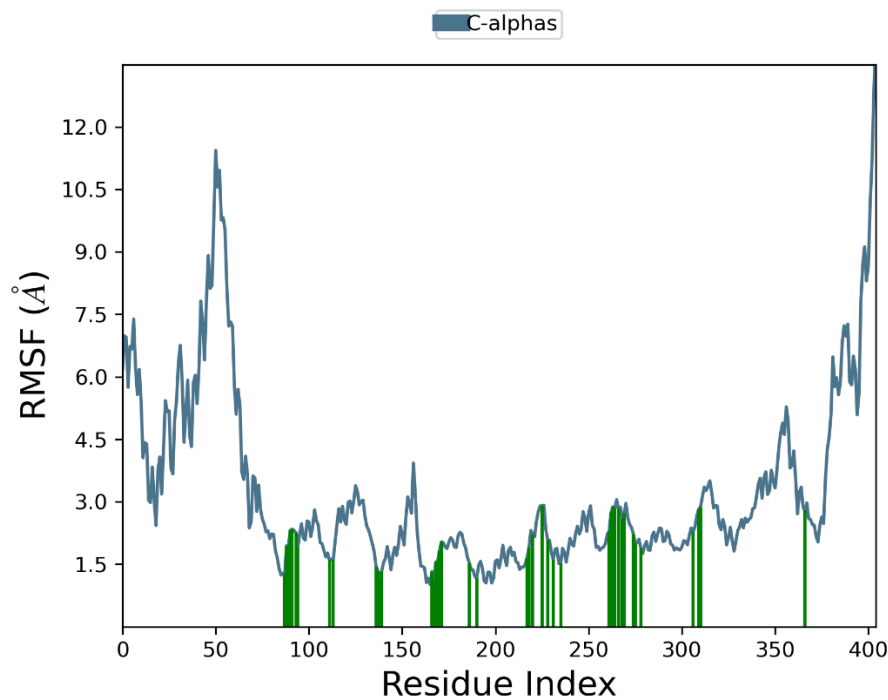


Figura 52 Grafico de la RMSF de la proteína 11 β HSD2 modelada en Alphafold y los contactos con el ligando carbenoxolona

Los elementos secundarios de la estructura proteica de la 11 β -HSD2, al igual que la isoforma 1, presenta principalmente cambios sobre las hélices alfa. En la Figura 53 se observa el cambio de la estructura secundaria por residuo a lo largo de 100 nanosegundos, el mayor número de cambios ocurre en el intervalo de 150 hasta el residuo 350 con pocos cambios sobre las láminas beta.

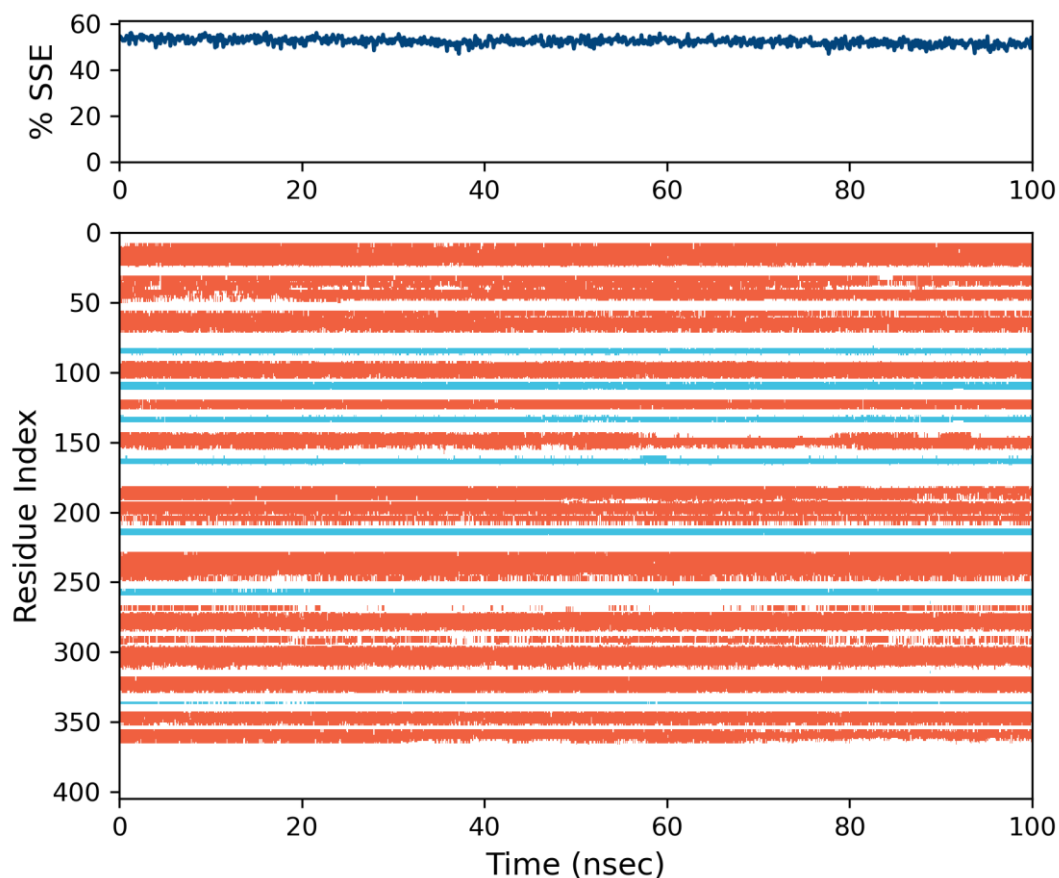


Figura 53 Cambios en los elementos de la estructura secundaria (SSE) de la proteína 11 β -HSD2 modelada en AlphaFold

La L-RMSF de la carbenoxolona para esta dinámica molecular (Figura 54) tiene una variación entre 1.2 y 2 Å en la posición de los átomos, los átomos de oxígeno numerados 38, 39, 40 y 41 fueron los que más fluctuaron, mientras que en átomos de carbono destacan 20, 21, 22, 23, 31, 32, 33 y 34.

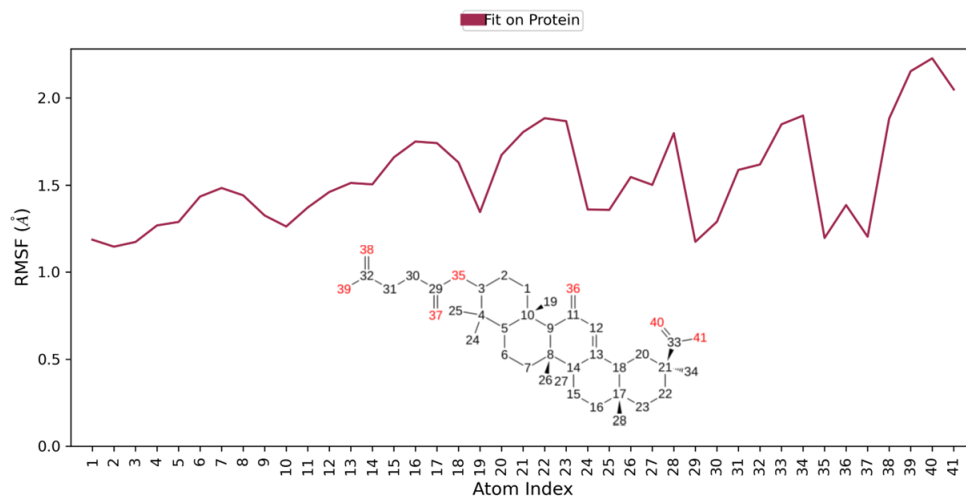


Figura 54 RMSF de la carbenoxolona en la dinámica molecular con la 11 β -HSD2

Por otro lado, los contactos que se llevan a cabo entre la proteína y el ligando se muestran en la Figura 55, la participación de los puentes de agua permite el acoplamiento de la carbenoxolona con los residuos PHE 265, GLY 263, PRO 262, LYS 236, TYR 226, SER219, HIS 170, ASN 167, ASP 138 y ASP 91. Otros contactos importantes son el de la GLY 169 que puede interaccionar mediante puentes de hidrógeno o puentes de agua, la TYR 232 es parte del centro catalítico y hace contacto con la carbenoxolona por interacción hidrofóbica y puentes de agua. El esquema en la Figura 56 detalla los contactos proteína-ligando de cada átomo de la carbenoxolona, podemos destacar las interacciones en la cadena lateral del carbono tres, la GLY 169 interactúa el 96% del tiempo con el átomo de oxígeno del carbonilo por un puente de hidrógeno, la HIS 170 y el ASP 91 pueden establecer varios puentes de agua durante la simulación, así como el ASP 138 que establece puente de agua con los oxígenos del ácido carboxílico. En el oxígeno del carbonilo en C11 se presenta el contacto con la LYS 236 que forma parte del sitio catalítico e interactúa el 46% del tiempo por puente de un hidrógeno proveniente del agua, también existe un contacto con ASN 167 el 32% de las veces por puente de hidrógeno. Al otro extremo de la molécula, en el ácido carboxílico del carbono veinte hace contacto con varios residuos, de los que se pueden destacar la SER 219 y TYR 232 de la triada catalítica que interactúan ambas por puentes de hidrógeno.

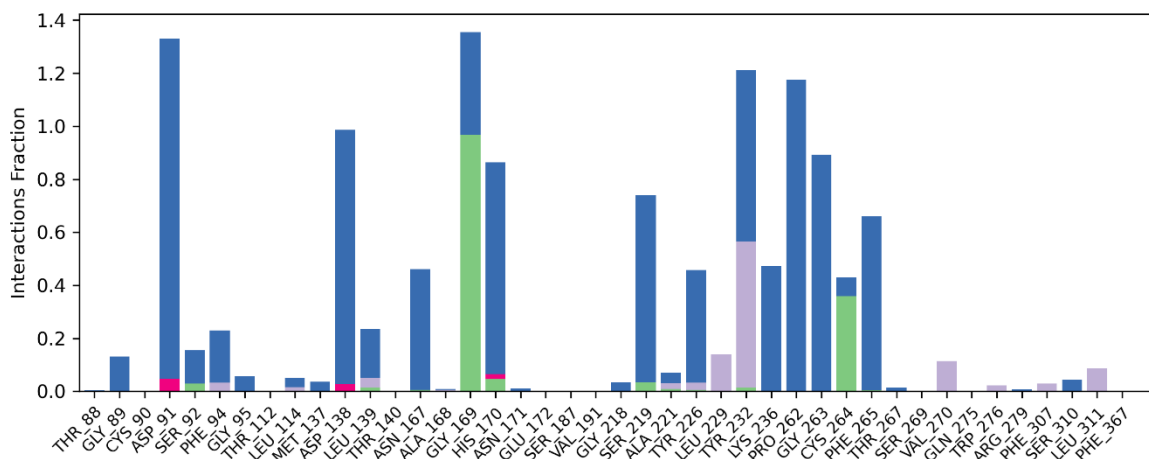


Figura 55 Histograma de contactos de la carbenoxolona con residuos de la proteína 11βHSD2 modelada en AlphaFold

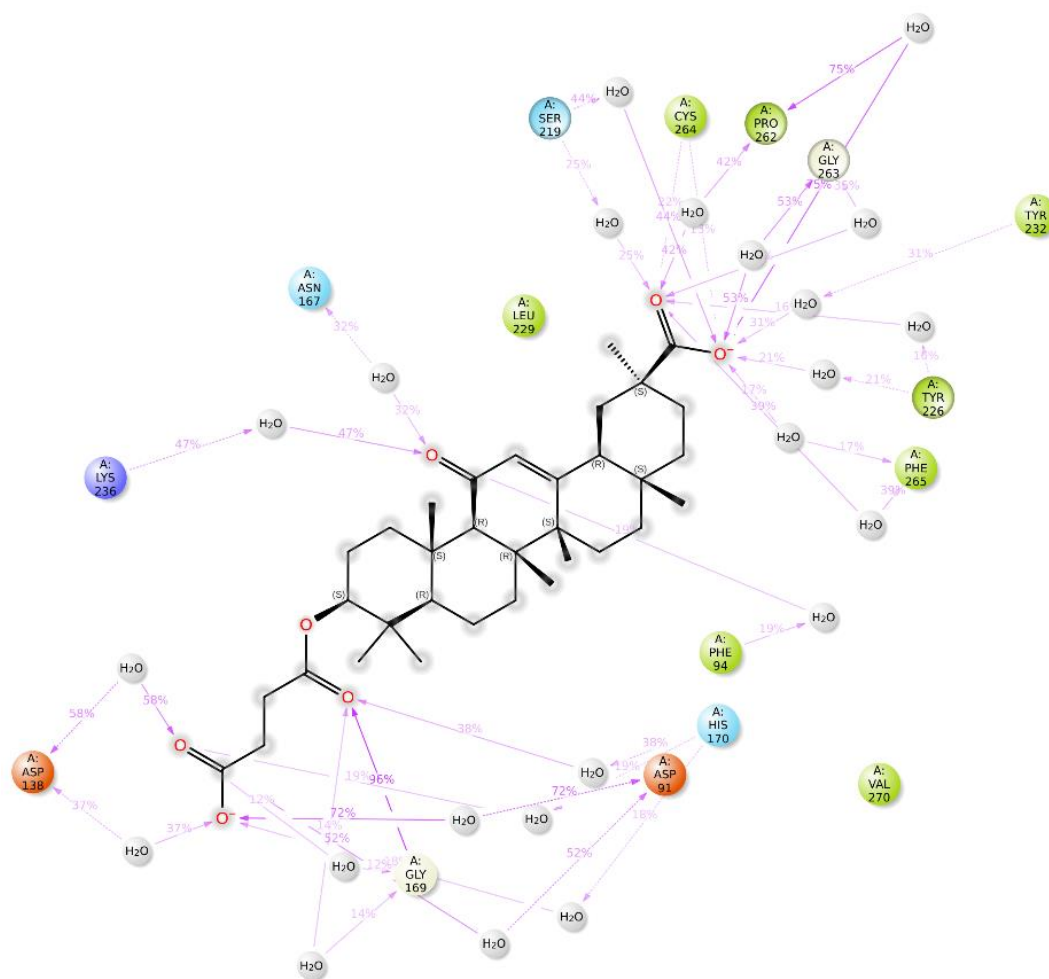


Figura 56 Diagrama 2D de contactos proteína-ligando entre los átomos de la carbenoxolona y los residuos de la 11β-HSD2 modelada en AlphaFold

El perfil de torsión de la carbenoxolona en esta dinámica (Figura 57) presenta similitudes a las dinámicas con las realizadas en 11β-HSD1, en los enlaces azul, verde claro, amarillo y rojo. Sin embargo, en el enlace morado se presenta en menor medida a 0° y en el enlace verde oscuro la rotación se favorece más por 90° en lugar de -90°.

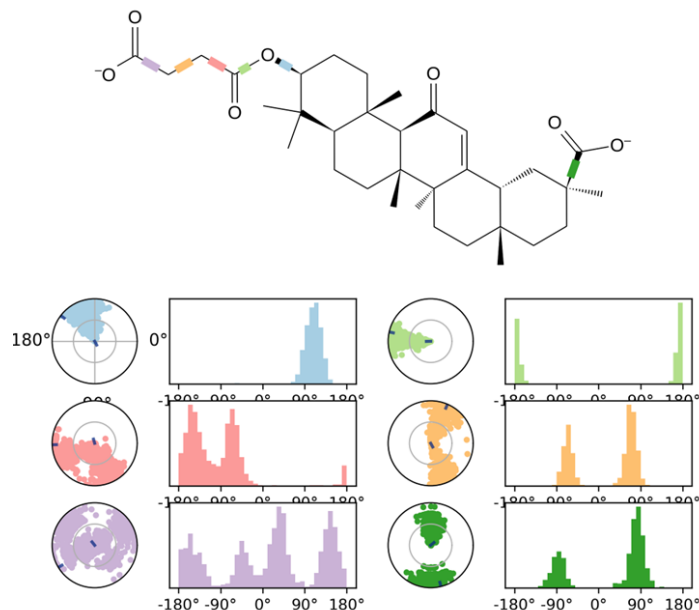


Figura 57 Perfil de torsión de la carbenoxolona en la dinámica molecular con la 11 β -HSD2 modelada en Alphafold

5.0 CONCLUSIONES

En este trabajo, se realizó el análisis por docking molecular de los sustratos endógenos de la 11 β -HSD1 en ambas isoformas, como reductasa y oxidasa, empleando los cristales 3QQP y 2BEL, respectivamente. En el docking score de los sustratos cortisona y cortisol, para cada actividad, se aprecia que la cortisona obtuvo un mejor valor de acoplamiento que el cortisol en la 11 β -HSD1 3QQP y de manera contraria en el cristal 2BEL. Además, de la triada catalítica, los residuos clave en la unión de los sustratos en el bolsillo catalítico son VAL 180 y ALA 223 para ambas direcciones, mientras que LEU 126 y TYR 177 son relevantes en la interacción de la cortisona con 3QQP, la LEU 217 participa en el acoplamiento del cortisol con 2BEL. La carbenoxolona superó en docking score a los sustratos endógenos en ambas actividades, siendo mejor en el acoplamiento con 2BEL, las interacciones con VAL 180 y TYR 177 permiten que esta molécula inhiba ambas formas de la 11 β -HSD1.

El modelado de la 11 β -HSD2 mediante redes neuronales con el programa de Alphafold permitió la obtención de la estructura en 3D de esta enzima carente de un cristal reportado, los docking realizados con dicha estructura fueron congruentes con base a los realizados con la isoforma 1 ya que los ligandos se encontraron en el mismo bolsillo de interacción cercanos a los residuos catalíticos de la enzima, adicionalmente se encontró que en este modelo los residuos de GLY 263 y TYR 226 interaccionan por puentes de hidrógeno con el cortisol permitiendo su acoplamiento en el sitio activo, la glicina en particular forma un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo en el carbono once. En el acoplamiento de la carbenoxolona, esta interaccionó de manera similar al cortisol compartiendo las interacciones de GLY 236, TYR 226 y CYA 264 además de interaccionar con la TYR 232 del sitio activo de forma hidrofóbica, otras interacciones que favorecen un mayor docking score que el

sustrato endógeno son los puentes de hidrógeno con SER 93 y GLY 169. En general el modelo obtenido por Alphafold permitió estudiar a la 11 β -HSD2 a nivel bioinformático en el acoplamiento de sustratos endógenos e inhibidor, sin embargo la ausencia del cofactor en la estructura puede no representar completamente la forma en que se acoplan los tres ligandos, esto se pudo observar en el docking score del cortisol y la cortisona, donde a diferencia de los modelos de la 11 β -HSD1, los valores para ambos sustratos fueron similares por lo que la presencia del cofactor podría detallar con más precisión la especificidad de la enzima por el cortisol.

Con base a la dinámica molecular de la carbenoxolona en la 11 β -HSD1 y 11 β HSD2 se pudieron detallar aquellas interacciones importantes para el acoplamiento estable de este inhibidor. De forma consecuente, para diseñar un inhibidor dual para las dos actividades de la 11 β -HSD1 la molécula debe contener grupos funcionales capaces de formar puentes de agua o interacciones iónicas con la THR 124 ya que es uno de los residuos que permanece interaccionando durante las simulaciones, aunado a este se requiere que el inhibidor interactúe con la TYR 183 catalítica de manera hidrofóbica, en el caso de la actividad oxidasa, y a través de puentes de hidrógeno para inhibir a la forma reductasa. Si se pretende diseñar un inhibidor selectivo a esta última, se requiere que este interactúe con TYR 183 Y LEU 217 por puente de hidrógeno. Por otro lado, la inhibición selectiva hacia la 11 β -HSD2 requiere de la interacción por puentes de agua con los tres residuos catalíticos de la enzima, SER 219, TYR 232 y LYS 236. Adicionalmente, se requiere interactuar con el ASP 91 mediante puentes de hidrógeno del agua y con la GLY 169 también por puentes de hidrógeno.

Las 11 β -HSD1/2 cuyo papel en el metabolismo es clave, de tal modo que un mal funcionamiento de estas se puede relacionar a algunas de las enfermedades más frecuentes en el mundo. Debido a esto el estudio de estas enzimas desde un enfoque bioinformático realizando docking y dinámica molecular permitió analizar el comportamiento de los sustratos cortisol y cortisona, y el inhibidor carbenoxolona al interactuar con las isoenzimas. Los resultados obtenidos permiten profundizar en las interacciones claves para la unión y posible inhibición de las enzimas, y gracias a estos es posible generar criterios para el diseño de nuevos fármacos con selectividad a la 11 β -HSD1 o a la 11 β -HSD2 según sea el contexto de la enfermedad.

6.0 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Transforming our world : the 2030 Agenda for Sustainable Development, Refworld (n.d.). <https://www.refworld.org/legal/resolution/unga/2015/en/111816> (accessed June 19, 2024).
- [2] GBD Compare, Inst. Health Metr. Eval. (n.d.). <http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare> (accessed June 19, 2024).
- [3] All causes, Mortal. DB (n.d.). <https://platform.who.int/mortality/themes/theme-details/MDB/all-causes> (accessed September 1, 2024).
- [4] M. Kisiela, A. Skarka, B. Ebert, E. Maser, Hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) in bacteria – A bioinformatic perspective, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 129 (2012) 31–46. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.08.002>.
- [5] D. Kupczyk, R. Bilski, M. Kozakiewicz, R. Studzińska, K. Kędziora-Kornatowska, T. Kosmowski, A. Pedrycz-Wieczorska, M. Głowacka, 11 β -HSD as a New Target in Pharmacotherapy of Metabolic Diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 8984. <https://doi.org/10.3390/ijms23168984>.
- [6] E.E. Ferrandi, S. Bertuletti, D. Monti, S. Riva, Hydroxysteroid Dehydrogenases: An Ongoing Story, *Eur. J. Org. Chem.* 2020 (2020) 4463–4473. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202000192>.
- [7] D. Lou, Y. Cao, H. Duan, J. Tan, B. Li, Y. Zhou, D. Wang, Characterization of a Novel Thermostable 7 α -hydroxysteroid Dehydrogenase, *Protein Pept. Lett.* (2024). <https://doi.org/10.2174/0109298665279004231229100320>.
- [8] T.M. Penning, Hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation of steroid hormone action, *Hum. Reprod. Update* 9 (2003) 193–205. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmg022>.
- [9] N. Atanassova, Y. Koeva, N. Atanassova, Y. Koeva, Hydroxysteroid Dehydrogenases – Biological Role and Clinical Importance – Review, in: *Dehydrogenases*, IntechOpen, 2012. <https://doi.org/10.5772/54149>.
- [10] M. Gao, K. Nie, M. Qin, H. Xu, F. Wang, L. Liu, Molecular Mechanism Study on Stereo-Selectivity of α or β Hydroxysteroid Dehydrogenases, *Crystals* 11 (2021) 224. <https://doi.org/10.3390/cryst11030224>.
- [11] B.P. Schlegel, J.M. Jez, T.M. Penning, Mutagenesis of 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase Reveals a “Push–Pull” Mechanism for Proton Transfer in Aldo–Keto Reductases, *Biochemistry* 37 (1998) 3538–3548. <https://doi.org/10.1021/bi9723055>.
- [12] T.M. Penning, The aldo-keto reductases (AKRs): Overview, *Chem. Biol. Interact.* 234 (2015) 236–246. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.09.024>.
- [13] N. Tanaka, T. Nonaka, K.T. Nakamura, A. Hara, SDR Structure, Mechanism of Action, and Substrate Recognition, *Curr. Org. Chem.* 5 (2001) 89–111. <https://doi.org/10.2174/1385272013375751>.
- [14] J. Cao, Y. Chen, H. Wang, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases and biomarkers in fetal development, *Toxicology* 479 (2022) 153316. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2022.153316>.
- [15] C. Almeida, C. Monteiro, S. Silvestre, Inhibitors of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 as Potential Drugs for Type 2 Diabetes Mellitus—A Systematic Review of Clinical and In Vivo Preclinical Studies, *Sci. Pharm.* 89 (2021) 5. <https://doi.org/10.3390/scipharm89010005>.

- [16] A.G. Atanasov, A. Odermatt, Readjusting the glucocorticoid balance: an opportunity for modulators of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity?, *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 7 (2007) 125–140. <https://doi.org/10.2174/187153007780832082>.
- [17] E.P. Gomez-Sanchez, C.E. Gomez-Sanchez, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: a growing multi-tasking family, *Mol. Cell. Endocrinol.* 526 (2021) 111210. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111210>.
- [18] K. Chapman, M. Holmes, J. Seckl, 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenases: Intracellular Gate-Keepers of Tissue Glucocorticoid Action, *Physiol. Rev.* 93 (2013) 1139–1206. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2012>.
- [19] S.K. Duraisingham, The Role of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 in Wound Healing in Uraemia., Thesis, Queen Mary University of London, 2020. <https://qmro.qmul.ac.uk/xmlui/handle/123456789/68581> (accessed May 12, 2024).
- [20] G.G. Lavery, E.A. Walker, N. Draper, P. Jeyasuria, J. Marcos, C.H.L. Shackleton, K.L. Parker, P.C. White, P.M. Stewart, Hexose-6-phosphate Dehydrogenase Knock-out Mice Lack 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1-mediated Glucocorticoid Generation*, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 6546–6551. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512635200>.
- [21] K.H.-Y. Tsai, M. Cooper, Recycling glucocorticoids: therapeutic implications of the 11 β -HSD1 enzyme system, *J. Endocrinol.* 258 (2023). <https://doi.org/10.1530/JOE-22-0289>.
- [22] R.W. Brown, K.E. Chapman, Y. Kotelevtsev, J.L. Yau, R.S. Lindsay, L. Brett, C. Leckie, P. Murad, V. Lyons, J.J. Mullins, C.R. Edwards, J.R. Seckl, Cloning and production of antisera to human placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2., *Biochem. J.* 313 (1996) 1007–1017.
- [23] H. Lin, M. Su, C. Wen, Y. Tang, H. Li, Y. Wu, R. Ge, X. Li, H. Lin, Chalcones from plants cause toxicity by inhibiting human and rat 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2: 3D-quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) and in silico docking analysis, *Food Chem. Toxicol.* 184 (2024) 114415. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.114415>.
- [24] R. Ge, Y. Huang, G. Liang, X. Li, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors as promising therapeutic drugs for diabetes: status and development, *Curr. Med. Chem.* 17 (2010) 412–422. <https://doi.org/10.2174/092986710790226147>.
- [25] Z. Chuanxin, W. Shengzheng, D. Lei, X. Duoli, L. Jin, R. Fuzeng, L. Aiping, Z. Ge, Progress in 11 β -HSD1 inhibitors for the treatment of metabolic diseases: A comprehensive guide to their chemical structure diversity in drug development, *Eur. J. Med. Chem.* 191 (2020) 112134. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112134>.
- [26] S.A. Latif, H.A. Pardo, M.P. Hardy, D.J. Morris, Endogenous selective inhibitors of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms 1 and 2 of adrenal origin, *Mol. Cell. Endocrinol.* 243 (2005) 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.08.006>.
- [27] S. Gregory, D. Hill, B. Grey, W. Ketelbey, T. Miller, G. Muniz-Terrera, C.W. Ritchie, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor use in human disease-a systematic review and narrative synthesis, *Metabolism* 108 (2020) 154246. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154246>.
- [28] C.S. Wyrwoll, M.C. Holmes, J.R. Seckl, 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenases and the brain: From zero to hero, a decade of progress, *Front. Neuroendocrinol.* 32 (2011) 265–286. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.12.001>.

- [29] A. Abbas, M. Schini, G. Ainsworth, S.R. Brown, J. Oughton, R.K. Crowley, M.S. Cooper, R.J. Fairclough, R. Eastell, P.M. Stewart, Effect of AZD4017, a Selective 11 β -HSD1 Inhibitor, on Bone Turnover Markers in Postmenopausal Osteopenia, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 107 (2022) 2026–2035. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgac100>.
- [30] L. Luo, D. Zhu, Z. Zhang, H. Zeng, M. Huang, S. Zhou, 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 amplifies inflammation in LPS-induced THP-1 cells, *Iran. J. Basic Med. Sci.* 26 (2023) 374–379. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2023.67927.14852>.
- [31] H. Li, J. Sheng, J. Wang, H. Gao, J. Yu, G. Ding, N. Ding, W. He, J. Zha, Selective Inhibition of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Attenuates High-Fat Diet-Induced Hepatic Steatosis in Mice, *Drug Des. Devel. Ther.* 15 (2021) 2309–2324. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S285828>.
- [32] X. Ma, Q.-Q. Lian, Q. Dong, R.-S. Ge, Environmental inhibitors of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, *Toxicology* 285 (2011) 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.04.007>.
- [33] C. Zhao, S. Wang, Y. Zhai, M. Wang, Y. Tang, H. Li, Y.J. Im, R. Ge, Direct inhibition of human and rat 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 by per- and polyfluoroalkyl substances: Structure-activity relationship and in silico docking analysis, *Toxicology* 488 (2023) 153484. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2023.153484>.
- [34] J. Vitku, L. Starka, M. Bicikova, M. Hill, J. Heracek, L. Sosvorova, R. Hampl, Endocrine disruptors and other inhibitors of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2: Tissue-specific consequences of enzyme inhibition, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 155 (2016) 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.07.007>.
- [35] K.R. Beck, M. Bächler, A. Vuorinen, S. Wagner, M. Akram, U. Griesser, V. Temml, P. Klusonova, H. Yamaguchi, D. Schuster, A. Odermatt, Inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 by the fungicides itraconazole and posaconazole, *Biochem. Pharmacol.* 130 (2017) 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.01.010>.
- [36] A. Janesick, B. Blumberg, The Role of Environmental Obesogens in the Obesity Epidemic, in: R.H. Lustig (Ed.), *Obes. Birth Matern. Prenat. Infl. Offspring*, Springer US, Boston, MA, 2011: pp. 383–399. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7034-3_19.
- [37] M. Ohshima, S. Ohno, S. Nakajin, Inhibitory effects of some possible endocrine-disrupting chemicals on the isozymes of human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase and expression of their mRNA in gonads and adrenal glands, *Environ. Sci. Int. J. Environ. Physiol. Toxicol.* 12 (2005) 219–230.
- [38] A. Joharapurkar, N. Dhanesha, G. Shah, R. Kharul, M. Jain, 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: potential therapeutic target for metabolic syndrome, *Pharmacol. Rep.* 64 (2012) 1055–1065. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70903-9](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70903-9).
- [39] A.M.J. MacLulich, K.J. Ferguson, L.M. Reid, I.J. Deary, J.M. Starr, J.M. Wardlaw, B.R. Walker, R. Andrew, J.R. Seckl, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, brain atrophy and cognitive decline, *Neurobiol. Aging* 33 (2012) 207.e1–207.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.09.010>.
- [40] V.L. Villemagne, V. Doré, L. Chong, M. Kassiou, R. Mulligan, A. Feizpour, J. Taylor, M. Roesner, T. Miller, C.C. Rowe, Brain 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Occupancy by XanmemTM Assessed by PET in Alzheimer's Disease and Cognitively Normal Individuals, *J. Alzheimers Dis.* 97 (2024) 1463–1475. <https://doi.org/10.3233/JAD-220542>.

- [41] J. Seckl, 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase and the brain: Not (yet) lost in translation, *J. Intern. Med.* 295 (2024) 20–37. <https://doi.org/10.1111/joim.13741>.
- [42] K. Sooy, J. Noble, A. McBride, M. Binnie, J.L.W. Yau, J.R. Seckl, B.R. Walker, S.P. Webster, Cognitive and Disease-Modifying Effects of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Inhibition in Male Tg2576 Mice, a Model of Alzheimer's Disease, *Endocrinology* 156 (2015) 4592–4603. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1395>.
- [43] V.S. Patil, N.A. Khatib, Triterpene saponins from *Barringtonia acutangula* (L.) Gaertn as a potent inhibitor of 11 β -HSD1 for type 2 diabetes mellitus, obesity, and metabolic syndrome, *Clin. Phytoscience* 6 (2020) 61. <https://doi.org/10.1186/s40816-020-00210-y>.
- [44] A. Anderson, B.R. Walker, 11 β -HSD1 Inhibitors for the Treatment of Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease, *Drugs* 73 (2013) 1385–1393. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0112-5>.
- [45] W. Wei, Q. Xu, L. Wu, G. Gong, Y. Tian, H. Huang, Z. Li, Drug development and potential targets for Cushing's syndrome, *Eur. J. Med. Chem.* 270 (2024) 116333. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116333>.
- [46] S. Oda, K. Ashida, M. Uchiyama, S. Sakamoto, N. Hasuzawa, A. Nagayama, L. Wang, H. Nagata, R. Sakamoto, J. Kishimoto, K. Todaka, Y. Ogawa, Y. Nakanishi, M. Nomura, An Open-label Phase I/IIa Clinical Trial of 11 β -HSD1 Inhibitor for Cushing's Syndrome and Autonomous Cortisol Secretion, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 106 (2021) e3865–e3880. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab450>.
- [47] M. Nishiyama, Y. Iwasaki, S. Nakayama, M. Okazaki, T. Taguchi, M. Tsuda, S. Makino, S. Fujimoto, Y. Terada, Tissue-specific regulation of 11 β hydroxysteroid dehydrogenase type-1 mRNA expressions in Cushing's syndrome mouse model, *Steroids* 183 (2022) 109021. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2022.109021>.
- [48] N. Cirillo, D.J. Morgan, M.C. Pedicillo, A. Celentano, L. Lo Muzio, M.J. McCullough, S.S. Prime, Characterisation of the cancer-associated glucocorticoid system: key role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, *Br. J. Cancer* 117 (2017) 984–993. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.243>.
- [49] A. Kanai, K.M. McNamara, E. Iwabuchi, Y. Miki, Y. Onodera, F. Guestini, F. Khalid, Y. Sagara, Y. Ohi, Y. Rai, R. Yamaguchi, M. Tanaka, M. Miyashita, T. Ishida, H. Sasano, Significance of glucocorticoid signaling in triple-negative breast cancer patients: a newly revealed interaction with androgen signaling, *Breast Cancer Res. Treat.* 180 (2020) 97–110. <https://doi.org/10.1007/s10549-020-05523-7>.
- [50] M. Cai, K. McNamara, Y. Yamazaki, N. Harada, M. Miyashita, H. Tada, T. Ishida, H. Sasano, The role of mineralocorticoids and glucocorticoids under the impact of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in human breast lesions, *Med. Mol. Morphol.* 55 (2022) 110–122. <https://doi.org/10.1007/s00795-022-00312-1>.
- [51] J. Chen, Q.-M. Liu, P.-C. Du, D. Ning, J. Mo, H.-D. Zhu, C. Wang, Q.-Y. Ge, Q. Cheng, X.-W. Zhang, Y.-W. Fan, H.-F. Liang, L. Chu, X.-P. Chen, B.-X. Zhang, L. Jiang, Type-2 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase promotes the metastasis of colorectal cancer via the Fgfbp1-AKT pathway, *Am. J. Cancer Res.* 10 (2020) 662.
- [52] J.W. Funder, Apparent mineralocorticoid excess, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 165 (2017) 151–153. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.03.010>.
- [53] C.A. Carvajal, A. Tapia-Castillo, A. Vecchiola, R. Baudrand, C.E. Fardella, Classic and Nonclassic Apparent Mineralocorticoid Excess Syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 105 (2020) e924–e936. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgz315>.

- [54] S.G. Inderbinen, M. Zogg, M. Kley, M. Smieško, A. Odermatt, Species-specific differences in the inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 by itraconazole and posaconazole, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 412 (2021) 115387. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115387>.
- [55] S. Sakkiyah, C. Meganathan, Y.-S. Sohn, S. Namadevan, K.W. Lee, Identification of Important Chemical Features of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type1 Inhibitors: Application of Ligand Based Virtual Screening and Density Functional Theory, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 5138–5162. <https://doi.org/10.3390/ijms13045138>.
- [56] J.S. Scott, F.W. Goldberg, A.V. Turnbull, Medicinal Chemistry of Inhibitors of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 (11 β -HSD1), *J. Med. Chem.* 57 (2014) 4466–4486. <https://doi.org/10.1021/jm4014746>.
- [57] C.-H. Fang, Y.-P. Li, Y. Li, J.-M. Yue, J. Bao, J.-H. Yu, Triterpenoids with multi-skeletons as 11 β -HSD1 inhibitors from *Euphorbia sikkimensis*, *Phytochemistry* 211 (2023) 113684. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2023.113684>.
- [58] D.A. Osman, M.A. Macías, L.H. Al-Wahaibi, N.H. Al-Shaalan, L.S. Zondagh, J. Joubert, S. Garcia-Granda, A.A. El-Emam, Structural Insights and Docking Analysis of Adamantane-Linked 1,2,4-Triazole Derivatives as Potential 11 β -HSD1 Inhibitors, *Molecules* 26 (2021) 5335. <https://doi.org/10.3390/molecules26175335>.
- [59] L.-D. Shao, Y. Bao, Y. Shen, J. Su, Y. Leng, Q.-S. Zhao, Synthesis of selective 11 β -HSD1 inhibitors based on dammarane scaffold, *Eur. J. Med. Chem.* 135 (2017) 324–338. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.059>.
- [60] H. Yamaguchi, T. Akitaya, T. Yu, Y. Kidachi, K. Kamiie, T. Noshita, H. Umetsu, K. Ryoyama, Homology modeling and structural analysis of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 1325–1330. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.01.054>.
- [61] H. Yamaguchi, T. Akitaya, Y. Kidachi, K. Kamiie, T. Noshita, H. Umetsu, K. Ryoyama, Mouse 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 for Human Application: Homology Modeling, Structural Analysis and Ligand-Receptor Interaction, *Cancer Inform.* 10 (2011) CIN.S8725. <https://doi.org/10.4137/CIN.S8725>.
- [62] H. Yamaguchi, T. Akitaya, T. Yu, Y. Kidachi, K. Kamiie, T. Noshita, H. Umetsu, K. Ryoyama, Molecular docking and structural analysis of cofactor-protein interaction between NAD⁺ and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, *J. Mol. Model.* 18 (2012) 1037–1048. <https://doi.org/10.1007/s00894-011-1140-2>.
- [63] F. Perutz, M.F. G., THE CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN DEOXYHAEMOGLOBIN AT 1.74 ANGSTROMS RESOLUTION, (2024). <https://doi.org/10.2210/pdb4hhb/pdb>.
- [64] K. Oppermann, U K., Structure of human 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in complex with NADP and carbenoxolone, (2024). <https://doi.org/10.2210/pdb2bel/pdb>.
- [65] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- [66] G. Madhavi Sastry, M. Adzhigirey, T. Day, R. Annabhimoju, W. Sherman, Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 27 (2013) 221–234. <https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>.

- [67] M.P. Jacobson, D.L. Pincus, C.S. Rapp, T.J.F. Day, B. Honig, D.E. Shaw, R.A. Friesner, A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction, *Proteins* 55 (2004) 351–367. <https://doi.org/10.1002/prot.10613>.
- [68] M.P. Jacobson, R.A. Friesner, Z. Xiang, B. Honig, On the Role of the Crystal Environment in Determining Protein Side-chain Conformations, *J. Mol. Biol.* 320 (2002) 597–608. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00470-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00470-9).
- [69] C. Lu, C. Wu, D. Ghoreishi, W. Chen, L. Wang, W. Damm, G.A. Ross, M.K. Dahlgren, E. Russell, C.D. Von Bargen, R. Abel, R.A. Friesner, E.D. Harder, OPLS4: Improving Force Field Accuracy on Challenging Regimes of Chemical Space, *J. Chem. Theory Comput.* 17 (2021) 4291–4300. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00302>.
- [70] Schrödinger Release 2024-3: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2024.
- [71] Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes | *Journal of Medicinal Chemistry*, (n.d.). <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm051256o> (accessed September 2, 2024).
- [72] K.J. Bowers, E. Chow, H. Xu, R.O. Dror, M.P. Eastwood, B.A. Gregersen, J.L. Klepeis, I. Kolossvary, M.A. Moraes, F.D. Sacerdoti, J.K. Salmon, Y. Shan, D.E. Shaw, Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters, in: *Proc. 2006 ACM/IEEE Conf. Supercomput.*, Association for Computing Machinery, New York, NY, USA, 2006: pp. 84-es. <https://doi.org/10.1145/1188455.1188544>.