

## Detección *in silico* de fitomoléculas con potenciales actividades inhibitorias de Nucleolinas (NCL)

Gimenez Vera, S.<sup>1\*</sup> ; Gayozo, E.<sup>1</sup> ; Marín, L.<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, San Lorenzo, Paraguay

\* E-mail del autor: [sebastiangimenezvera@gmail.com](mailto:sebastiangimenezvera@gmail.com)

**Detección *in silico* de fitomoléculas con potenciales actividades inhibitorias de Nucleolinas (NCL).** Las nucleolinas son proteínas localizadas generalmente en el núcleo celular, citoplasma y la superficie de las membranas cumpliendo funciones imprescindibles para la fisiología celular. Sin embargo, su mal funcionamiento se encuentra íntimamente relacionado con muchos tipos de cáncer, por lo que pueden ser consideradas como proteínas dianas para la búsqueda de moléculas con potencial inhibitorio con la finalidad de desarrollar nuevas estrategias para combatir al cáncer. Esta investigación tuvo como objetivos detectar fitoconstituyentes que presenten afinidades de interacción por el dominio de unión al ARN (DUA) de las nucleolinas y caracterizar dichas interacciones proteína-ligando mediante el análisis del acoplamiento molecular. Se preseleccionaron quince fitomoléculas con diferentes actividades biológicas para su estudio y se determinó el índice de drogabilidad del dominio DUA de las nucleolinas, las cuales presentaron un valor de 0,80 siendo altamente drogable. Posteriormente, se realizaron las pruebas de acoplamiento molecular entre los fitoconstituyentes seleccionados y la nucleolina. Los datos obtenidos en los ensayos de acoplamiento molecular evidenciaron que los fitoconstituyentes que presentaron mayor afinidad de interacción *in silico* fueron los triterpenos Maytenina, Taraxerol, Cucurbitacina B y Pristimerina, los cuales demostraron valores de energías libre de interacción ( $\Delta G$ ) iguales a  $-10,80 \pm 0,03$  kcal.mol<sup>-1</sup>,  $-10,58 \pm 0,14$  kcal.mol<sup>-1</sup>,  $-9,58 \pm 0,12$  kcal.mol<sup>-1</sup> y  $-9,48 \pm 0,35$  kcal.mol<sup>-1</sup> respectivamente. Los residuos involucrados activamente en las interacciones con las biomoléculas estabilizando la formación de la estructura de los complejos proteína-ligando fueron Asn100, Tyr103, Tyr134 y Arg158. Los hallazgos sugieren que dichos triterpenos podrían actuar como potenciales inhibidores de las nucleolinas debido a las afinidades manifestadas, sin embargo, estos resultados necesitan ser confirmados mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.

**Palabras clave:** Acoplamiento molecular, fitomoléculas, inhibidores, nucleolina

***In silico* detection of phytomolecules with potential inhibitory activities of Nucleolins (NCL).** Nucleolins are proteins found in the cell's nucleus, cytoplasm, and on membrane surfaces, performing critical functions for in the cell's physiology. It's malfunction is linked to various types of cancer, and thus are considered as target proteins in the search for molecules with potential anticancer effects. This research aims to detect phytoconstituents that show interaction affinities for the RNA-binding domain (RBD) of nucleolins and to characterize said protein-ligand interactions through molecular docking analysis. Fifteen phytomolecules with different biological profiles were preselected for study and

the druggability index of nucleolin's RBD domain was determined, which presented a value of 0.80, said site being highly druggable. Subsequently, molecular docking tests were carried out between the selected phytoconstituents and nucleolin. Results of the molecular docking assays revealed that the triterpenes Maytenin, Taraxerol, Cucurbitacin B, and Pristimerin have a higher *in silico* binding affinity, with interaction free energies ( $\Delta G$ ) equal to  $-10.80 \pm 0.03 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ,  $-10.58 \pm 0.14 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ,  $-9.58 \pm 0.12 \text{ kcal.mol}^{-1}$  and  $-9.48 \pm 0.35 \text{ kcal.mol}^{-1}$  respectively. The residues actively involved in the interactions with biomolecules, stabilizing the formation and the structure of the protein-ligand complexes were Asn100, Tyr103, Tyr134 and Arg158. The findings suggest that these triterpenes could act as potential nucleolin inhibitors due to the affinities found, however, these results need to be confirmed by *in vitro* and *in vivo* assays.

**Keywords:** Molecular docking, phytomolecules, inhibitors, nucleolin

## INTRODUCCIÓN

La nucleolina (NCL) es una proteína multifuncional presente en las células eucariotas, cumple funciones vitales, principalmente en la proliferación celular, la replicación y reparación del ADN y en la expresión de proteínas; debido a esto, su presencia en las etapas tempranas del cáncer es esencial para el desarrollo de los tumores (Carvalho et al., 2021). En etapas tardías del cáncer cumple funciones de supervivencia de células malignas, promoviendo la anulación de la apoptosis, la angiogénesis y la regulación de la expresión de la proteína p53, mediante la asociación con el ARN mensajero (ARNm) que codifica dicha proteína (Abdelmohsen y Gorospe, 2012). Por lo que la regulación de las actividades de la nucleolina en células cancerosas es de suma importancia para combatir al proceso de carcinogénesis en etapas temprana.

El desarrollo de nuevos fármacos en la actualidad requiere del cumplimiento de requisitos que conllevan una gran cantidad de tiempo y dinero, con la finalidad de reducir estos factores, la primera etapa (búsqueda de moléculas con potenciales farmacológicos) se lleva a cabo mediante el empleo de poderosas plataformas bioinformáticas, que nos permiten conocer y predecir molé-

culas que presenten mejores perfiles energéticos de afinidades en la interacción (receptor-ligando) con el sitio activo de las proteínas diana (macromoléculas que deseamos inactivar o bloquear; Anwar et al., 2021).

Las plantas son fuente de una gran cantidad de compuestos químicos (fitoconstituyentes) a los cuales se denominan de forma genérica metabolitos secundarios. Estos fitoconstituyentes cumplen numerosas funciones en la planta como ser la defensa ante ataques o alguna amenaza, la atracción de polinizadores y en algunos casos, son simples productos de desecho (Ringuelet y Viña, 2013). Varios estudios han señalado que ciertos tipos de metabolitos secundarios, como los alcaloides, los terpenoides y los polifenoles, inhiben el crecimiento y desarrollo celular, también se ha observado que son capaces de inhibir la angiogénesis y regular la expresión o las actividades de algunas proteínas que tienen un papel importante en la resistencia a fármacos de las células cancerosas (Wink, 2015).

Por estos motivos, el objetivo principal de esta investigación fue detectar moléculas de origen vegetal que presenten afinidades de interacción por el dominio de unión al ARN de la nucleolina y caracterizar dichas uniones mediante herramientas computacionales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de estructuras químicas de fitoconstituyentes con actividades biológicas

Primeramente, se realizó la búsqueda bibliográfica de moléculas de origen vegetal que presentan experimentalmente actividades biológicas como antioxidantes. Se seleccionaron un total de quince fitomoléculas y posteriormente se procedió a obtener los archivos de las estructuras químicas bidimensionales de cada una de estas moléculas de la base de datos PubChem (Kim et al., 2016).

### Determinación de la drogabilidad del dominio DUA

La estructura molecular de la proteína humana NCL (PDB: 2KRR; Arumugam et al., 2010) se obtuvo de la base de datos Protein Data Bank (Berman et al., 2000). Posteriormente se procedió a determinar el índice de drogabilidad del dominio de unión al ARN de la nucleolina, para ello se realizó una caracterización de los sitios activos posibles empleando la herramienta DoGSiteScorer (Volkamer et al., 2012).

### Acoplamiento molecular entre la nucleolina y los fitoconstituyentes seleccionados

Las estructuras moleculares de la NCL y las quince fitomoléculas seleccionadas fueron provistas de átomos de hidrógenos polares que cumplen con un papel importante para las interacciones, este paso se realizó empleando un pH fisiológico de 7,4. Posteriormente, se llevó a cabo la auto-optimización de las moléculas utilizando el campo de fuerza MMFF94 hasta el alcance de un estado energético favorable, para ello se empleó el programa Avogadro y el programa UCSF Chimera versión 1.14 (Pettersen et al., 2004; Hanwell et al., 2012).

Los ensayos computacionales de acoplamiento molecular entre los fitoconstituyentes y la nucleolina se llevaron a cabo empleando una grilla

de interacción de dimensiones  $42 \times 43 \times 52 \text{ \AA}^3$ , para esto se utilizó el programa AutoDock Vina (Trott y Olson, 2010).

Como control se utilizó al Paracetamol ya que interactúa con el sitio activo de la NCL en una región muy superior del mismo y con una energía libre de interacción muy desfavorable.

La visualización de los resultados y la determinación de las interacciones intermoleculares de los complejos receptor-ligando se llevaron a cabo empleando los programas UCSF Chimera versión 1.14 (Pettersen et al., 2004) y UCSF ChimeraX versión 1.21 (Pettersen et al., 2021). La determinación de los residuos activos y las interacciones intermoleculares involucradas en la formación del complejo se realizó empleando el programa PoseView (Fricker et al., 2004; Stierand et al., 2006).

Posteriormente, se seleccionaron aquellos ligandos que presentaron energías libres de interacción ( $\Delta G$ ) menores a  $-8,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , para ser sometidas a ensayos de acoplamientos exhaustivos con la finalidad de reducir los posibles errores en las simulaciones de acoplamiento molecular.

### Análisis estadístico de datos

Los datos obtenidos en las simulaciones fueron analizados mediante la prueba de normalidad y la prueba de Kruskal-Wallis. Para ello se utilizó el programa PAST versión 3.23 (Hammer et al., 2001).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se pudo detectar la presencia de un sitio drogable presente en el dominio DUA, una región con un alto valor de drogabilidad (0,80), la misma comprende una superficie de  $2524 \text{ \AA}^2$  y un volumen de  $1174,85 \text{ \AA}^3$ , este índice de drogabilidad estimado nos sugiere que esta región de la proteína presenta propiedades óptimas para buscar y diseñar moléculas que puedan demostrar aptitudes para actuar como potencial inhibidor de

dicho dominio (Figura 1). El término drogabilidad se refiere al potencial que presenta una diana (ligada a la modificación de una enfermedad) de ser regulada mediante moléculas biodisponibles ingeridas por vía oral (Volkamer et al., 2012).

Este sitio activo presenta un total de 284 átomos alojados en dicha región, de los cuales 198 átomos son de carbono (C), 38 átomos de nitrógeno (N) y 48 átomos de oxígeno (O). Entre los mismos, se pudieron identificar grupos funcionales (37) que intervienen regularmente en la formación de puentes de hidrógeno como donadores, un total de 94 grupos funcionales que participan en la recepción de los puentes de hidrógeno y 140 grupos funcionales que participan en interacciones hidrofóbicas (Tabla 1).

En cuanto a la composición de los residuos, el sitio drogable cuenta con un 28% de aminoácidos apolares representado por Ala (1), Ile (3), Leu (4), Phe (4), Pro (2), Val (1), un 28% de aminoácidos polares representado por Asn (3), Gln (1), Gly (5), Thr (2), Tyr (4), un 25% de aminoácidos positivos representado por Arg (3), Lys (10) y un 19% de aminoácidos negativos representados por Asp (2) y Glu (8) (Tabla 1).

Los residuos son de suma importancia en la estructura del receptor, ya que son los portadores de los átomos y por ende grupos funcionales, los

cuales son capaces de generar las interacciones intermoleculares que estabilizarán la formación del complejo receptor-ligando, dichas interacciones pueden ser del tipo: hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, apilamientos de orbitales  $\pi$ , de van der Waals, puentes de hidrógeno débiles o no convencionales, puentes salinos, apilamientos aromáticos e interacciones electrostáticas catión- $\pi$  (Ferreira de Freitas y Schapira, 2017).

Las pruebas de acoplamiento molecular revelaron valores de energía libre de interacción ( $\Delta G$ ) entre  $-10,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$  en el caso del ligando Maytenina y  $-6,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$  en el caso de la Cloroquina. En base a estos valores energéticos se procedió a seleccionar los constituyentes Maytenina, Taraxerol, Cucurbitacina B, Pristimerina, Uncarina C, Intrapetacina A y Rotenona, las cuales demostraron energías libres de interacción favorables con valores menores  $-8,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$  (Figura 2, Tabla 2).

Estos valores representan el cambio de energía causado por la formación del complejo NCL-fitomolécula, que es el resultado de las propiedades fisicoquímicas tanto de los residuos que componen el sitio activo de la proteína, así como las propiedades de los ligandos analizados (Baig et al., 2018). Es importante destacar que la energía de acoplamiento obtenida en estas si-

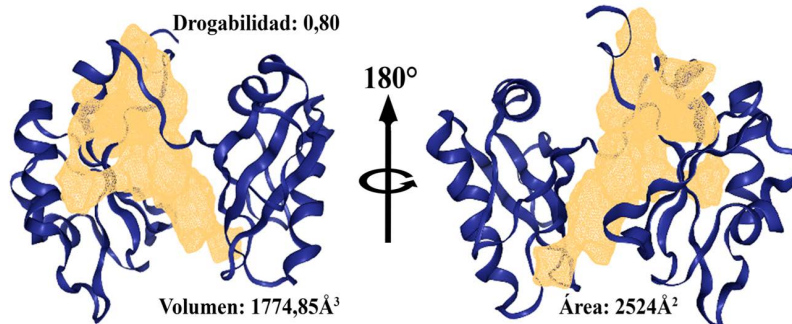


Figura 1. A, B. Sitio drogable (región en amarillo) identificado en el dominio de unión al ARN (DUA) de la nucleolina humana (PDB: 2KRR)

**Tabla 1.** Descriptores del sitio activo del dominio de unión al ARN (DUA) de la nucleolina humana

Elementos	N	Grupos Funcionales	N	Composición de Residuos	N	Residuos	N
Átomos en el sitio activo	284	Donadores en puentes de hidrógeno	37	Relación de aminoácidos apolares	0,28	Ala	1
						Arg	3
						Asn	3
						Asp	2
						Gln	1
Carbono	198	Receptores en puentes de hidrógeno	94	Relación de aminoácidos polares	0,28	Glu	8
						Gly	5
						Ile	3
						Leu	4
						Lys	10
Nitrógeno	38	Interacciones hidrofóbicas	140	Relación de aminoácidos positivos	0,25	Phe	4
						Pro	2
						Thr	2
Oxígeno	48	Relación de hidrofobicidad del segmento	0,52	Relación de aminoácidos negativos	0,19	Tyr	4
						Val	1

N: Número

mulaciones solo son aproximaciones, debido que desafortunadamente la entropía del sistema es difícil considerar en un ensayo computacional, por lo que resulta complicado que estos valores se ajusten a la energía libre de unión nativa (Guedes et al., 2013).

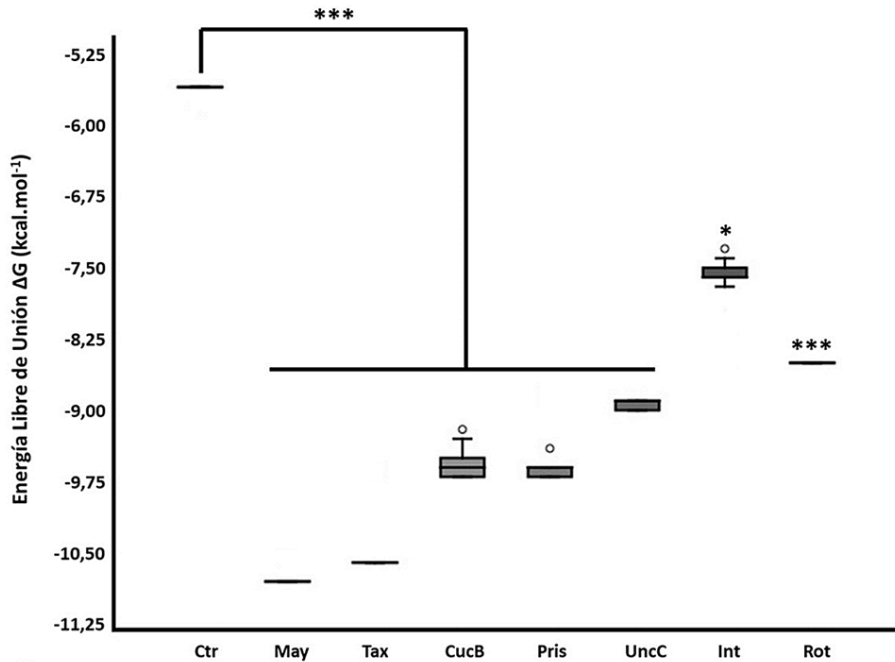
La Maytenina interactúa con el centro del sitio activo de la NCL humana, presenta una energía de interacción de  $-10,80 \pm 0,03$  kcal.mol<sup>-1</sup>. Los residuos activos involucrados en la formación del complejo son Tyr134, Phe50 y Phe11. Esta molécula interactúa con el residuo Tyr134 formando principalmente puentes de hidrógeno del tipo O-H---O con la misma, también se registró la formación de interacciones de van der Waals entre la Maytenina y los residuos Phe50 y Phe11 (Figura 3 A).

Es importante resaltar que las interacciones hidrofóbicas y los puentes de hidrógeno son las más frecuentes e importantes en la formación de los complejos receptor-ligando, las interacciones hidrofóbicas se dan con mucha frecuencia y

son el resultado de la interacción entre átomos carbono, carbono y algún halógeno o carbono y átomos de azufre, por otra parte los puentes de hidrógeno se dan como resultado del nexo entre un átomo de hidrógeno y un átomo electrostáticamente muy negativo (O, N, S), sin embargo en los complejos receptor-ligando los puentes de hidrógeno más comunes son los del tipo N-H---O y O-H---O (Ferreira de Freitas y Schapira, 2017; Bulusu y Desiraju, 2020) (Figura 3 A).

A su vez el complejo formado con la Pristimerina demostró afinidad de interacción con la región central del sitio activo de la NCL, con una energía de interacción de  $-9,48 \pm 0,35$  kcal.mol<sup>-1</sup>. El residuo involucrado activamente en la estabilización de la estructura del complejo formado fue la Tyr103. Se pudo identificar entre este residuo y el ligando la formación de un puente de hidrógeno del tipo O-H---O (Figura 3 B).

La Maytenina y la Pristimerina son compuestos presentes en las hojas y rizoma de los géneros *Monteverdia* y *Celastrus*, presentan actividades



**Figura 2.** Energía de unión de las fitomoléculas seleccionadas para el análisis exhaustivo. \* $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$ . Ctr: Control, May: Maytenina, Tax: Taraxerol, CucB: Cucurbitacina B, Pris: Pristimerina, UncC: Uncarina C, Int: Intrapetacina, Rot: Rotenona

antiinflamatorias, anticancerígenas, abortivas, antiulcerogénica y antirreumática (Akhtar y Swamy, 2018). Entre las actividades anticancerígenas se pueden citar la actividad antiproliferativa y pro-apoptótica en células del carcinoma escamoso de cabeza y cuello, además de la regulación negativa de ARNmi-27a y ARNmi-20a (Akhtar y Swamy, 2018; Hernandez et al., 2020).

De igual manera, el complejo formado con la molécula de Taraxerol, demostró una mayor afinidad de interacción por la región central del sitio activo de la NCL, con una energía libre de interacción de  $-10,58 \pm 0,14$  kcal.mol<sup>-1</sup>. Los residuos activos implicados en la estabilización de la estructura fueron la Asn100, la Phe50, Phe11 y la Lys130 (Figura 4A).

Las interacciones intermoleculares que fueron registradas con la molécula de Taraxerol fueron puentes de hidrógeno del tipo O-H---O con el

residuo Asn100, e interacciones adicionales del tipo van der Waals con los residuos Phe11, Phe50 y Lys130 (Figura 4A).

El Taraxerol es un compuesto orgánico presente en las raíces, los rizomas, las partes aéreas y en las semillas de una gran variedad de familias vegetales, presenta actividades antiinflamatorias, anticancerígenas y potenciales actividades antimicrobianas (Zafar y Sharma, 2015).

Estudios revelaron que esta molécula también presenta actividades antitumorales ante la transformación de células de la piel a células cancerígenas mediante la inducción con 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) (Takasaki et al., 1999). Esta molécula induce a la apoptosis e inhibe el ciclo celular en el colesteatoma epitelial de oído medio al inhibir la expresión del grupo de proteínas NF-κB (Liao et al., 2018). También se ha registrado que es capaz de inducir a la

**Tabla 2.** Energía libre de interacción entre fitomoléculas y el dominio DUA de la nucleolina

Fitomoléculas	Especie	Órganos	PubChem CID	ΔG (kcal.mol <sup>-1</sup> )
Maytenina	<i>M. ilicifolia</i>	H, Ri (Akhtar & Swamy, 2018).	355376	-10,6
Taraxerol	<i>T. officinale</i>	R, T, C, H y S (Zafar & Sharma, 2015).	92097	-9,6
Cucurbitacina B	Cucurbitaceae	R, H (Tallamy et al., 2005).	5281316	-9,6
Pristimerina	<i>M. ilicifolia</i>	H, Ri (Akhtar & Swamy, 2018).	159516	-9,4
Uncarina C	<i>U. tomentosa</i>	R, T, C (Akhtar & Swamy, 2018).	10429112	-8,9
Intrapetacina A	<i>L. intrapetiolaris</i>	R (Oberlies et al., 2001).	44584771	-8,6
Rotenona	<i>Tephrosia sp.</i>	H, T, R, S, V (Irvine & Freyre, 1959)	6758	-8,5
3,5-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona	<i>C. sativus, T. toxicaria</i>	H (Thomas et al., 2012).	5379262	-8,3
Genisteina	Fabaceae	Tp (Kaufman et al., 1997).	5280961	-8,0
Ácido de caracasina	<i>C. caracasana</i>	F (Suárez et al., 2009).	122364134	-7,8
Lapachol	<i>H. impetiginosus</i>	C (Akhtar & Swamy, 2018).	3884	-7,7
Quinina	<i>C. officinalis</i>	C (Kacprzak, 2013).	3034034	-7,7
Uncarina F	<i>U. tomentosa</i>	R, T, C (Akhtar & Swamy, 2018).	12304288	-7,7
Quinidina	<i>C. officinalis</i>	C (Kacprzak, 2013).	441074	-7,5
Cloroquina	<i>C. officinalis</i>	C (Kacprzak, 2013).	2719	-6,4
Paracetamol*	—	—	1983	-5,6

\*Testigo negativo, H: hojas, Ri: rizoma, R: raíz, T: tallo, C: corteza, S: semillas, V: vainas, Tp: toda la planta, F: Flores

apoptosis principalmente por la vía mitocondrial, liberando citocromo c al citosol y activando las caspasas 9 y 3 (Yao et al., 2017).

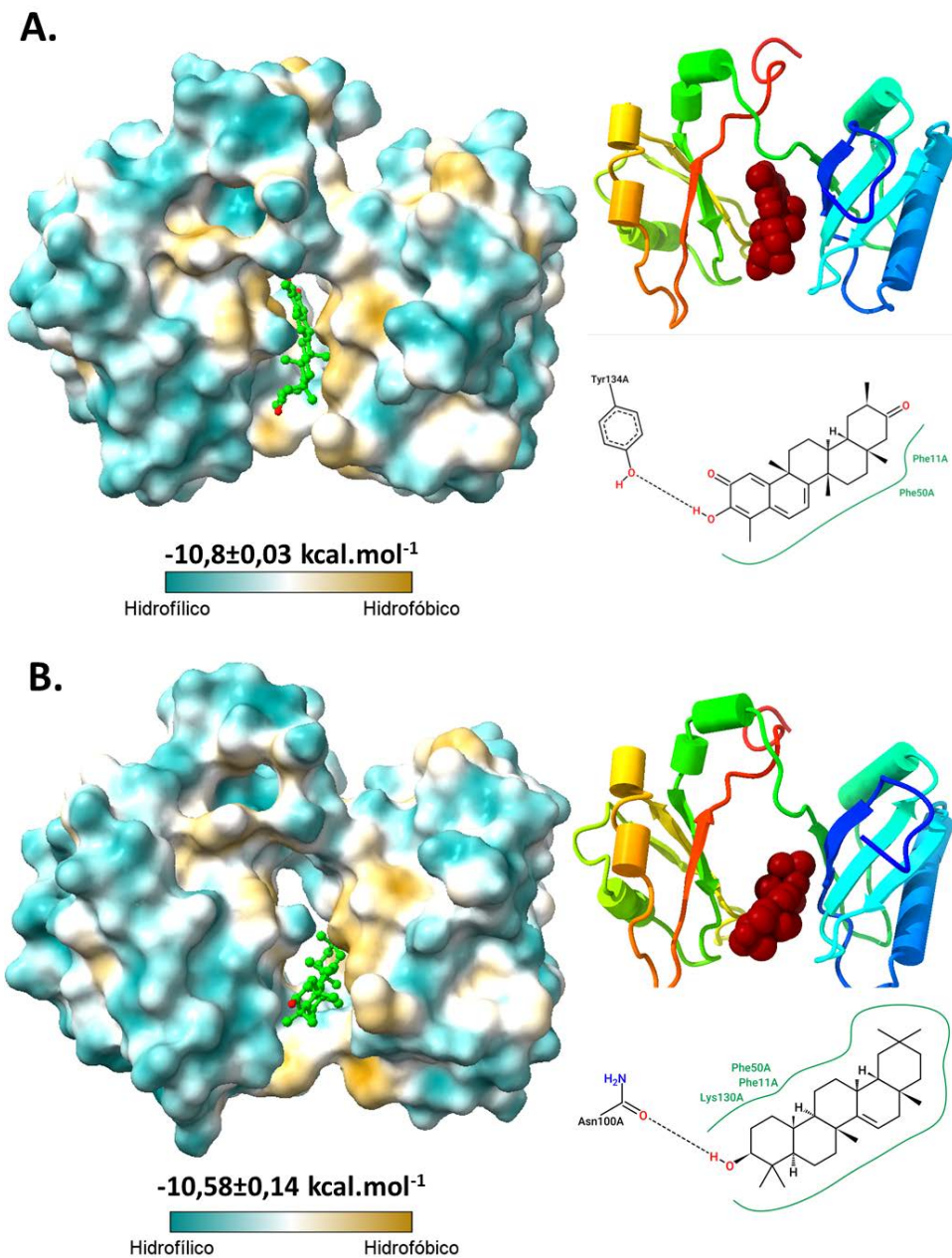
El complejo formado con la molécula de Cucurbitacina B registró una energía libre de interacción de  $-9,58 \pm 0,12$  kcal.mol<sup>-1</sup>, con afinidades de interacción por el sitio activo de la NCL. Los residuos que se encontraban participando activamente en la estabilización de la estructura del complejo fueron la Asn100, la Arg158, la Tyr134, la Phe11 y la Ile132. Se pudo identificar la formación de puentes de hidrógeno del tipo O-H...O con los residuos Asn100 y Tyr134, y puentes de hidrógeno del tipo N-H...O con el residuo Arg158, también se pudo detectar la formación de interacciones del tipo van der Waals con el residuo Phe11 y con el residuo Ile132 (Figura 4B).

La Cucurbitacina B es una molécula presente principalmente en las hojas y raíces de la familia

Cucurbitaceae, presenta actividades citotóxicas, inhibiendo principalmente el ciclo celular (Tallamy et al., 2005; Akhtar y Swamy, 2018). Los triterpenos son un grupo de compuestos orgánicos caracterizados por la presencia de un grupo isopreno en su estructura y presentan actividades tanto anticancerígenas, antiinflamatorias, antioxidantes, antivirales, antibacteriales como antifúngicas (Yin, 2012). Son un producto secundario del metabolismo de las plantas y se encuentran distribuidos comúnmente en forma de estructura pentacíclica, por todos los órganos de estas, a excepción de las flores (Jäger et al., 2009).

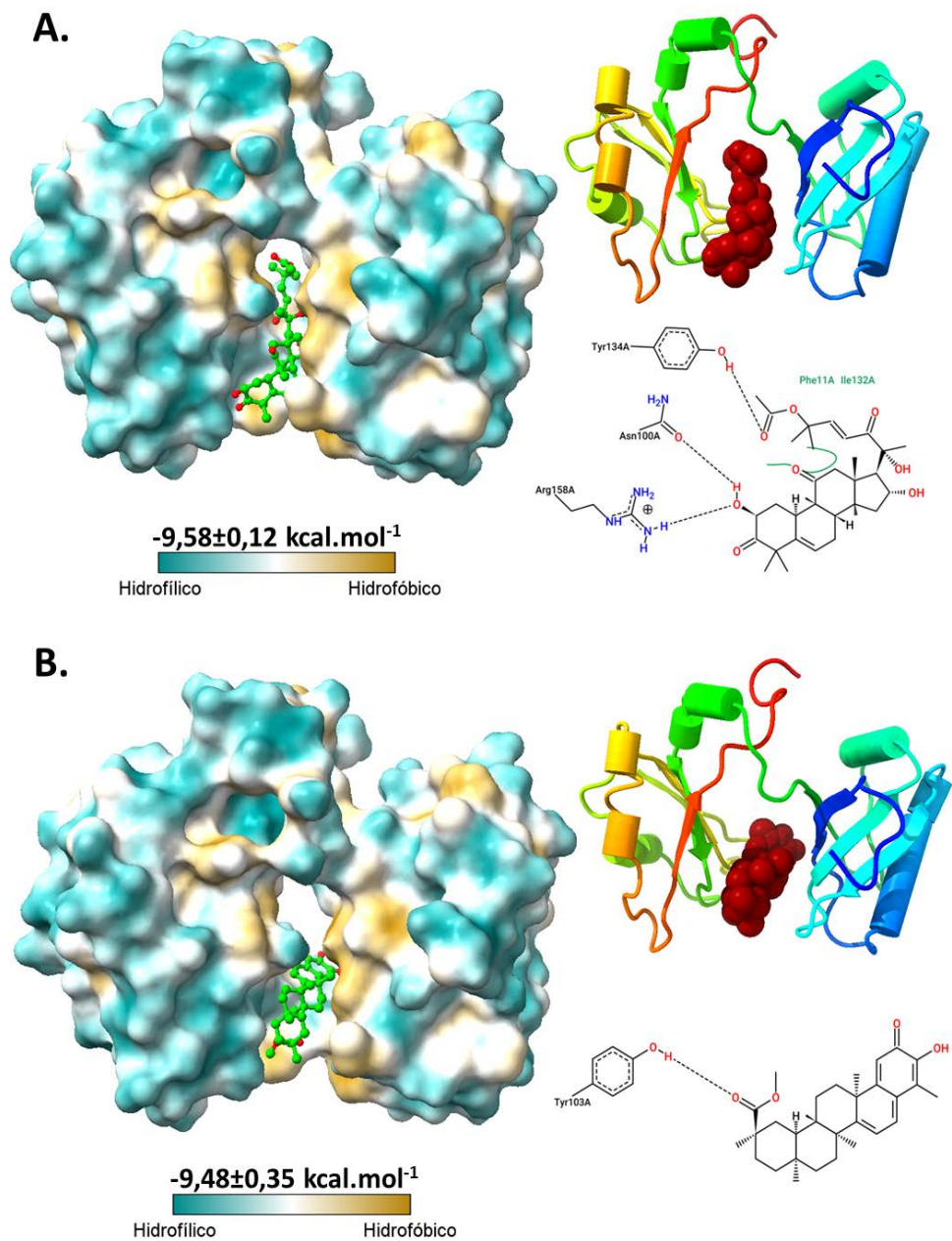
Su función como anticancerígenos la desempeñan inhibiendo la proliferación celular e induciendo la muerte de células tumorales teniendo como blanco múltiples tipos de dianas cancerígenas como la proteasoma, Bcl-2, NF-kB, el activador de transcripción y transductor 3 (STAT3), el





**Figura 3.** Modelo tridimensional de superficies del dominio DUA, modelo de tubos y planos del dominio DUA e interacciones intermoleculares presentes en el complejo receptor-ligando **A.** NCL-Maytenina. **B.** NCL-Pristimerina. Líneas punteadas negras: puentes de hidrógeno, línea verde continua: interacciones de van der Waals





**Figura 4.** Modelo tridimensional de superficies del dominio DUA, modelo de tubos y planos del dominio DUA, e interacciones intermoleculares presentes en el complejo receptor-ligando **A.** NCL-Taraxerol. **B.** NCL-Cucurbitacina. B. Líneas punteadas negras: puentes de hidrógeno, línea verde continua: interacciones de van der Waals

factor de necrosis tumoral (TNF), la angiogénesis y TLR (Gill et al., 2016). Sin embargo, las interacciones moleculares con la NCL aún no se han registrado en este grupo de moléculas.

La Maytenina y Pristimerina cuentan con diversas actividades anticancerígenas demostradas contra células de cáncer colorrectal (Yousef et al., 2016; Park y Kim, 2018; Zhao et al., 2021), cáncer pancreático (Wang et al., 2012; Deeb et al., 2014), cáncer de próstata (Yang et al., 2008; Lee et al., 2016), cáncer de pulmón (Li et al., 2020), cáncer de mama (Mu et al., 2012; Lee et al., 2013; Cevatemre et al., 2018; Zhao et al., 2019; Cheng et al., 2020;). Los mecanismos por los cuales logran inhibir el crecimiento de las células cancerígenas incluyen la inducción de la apoptosis, por medios como la activación de especies reactivas de oxígeno (ROS), inactivación de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e inhibición de proteínas que favorecen la supervivencia de células como AKT, NF- $\kappa$ B o mTOR (Deeb et al., 2014; Zhao et al., 2019). Además de bloquear la proliferación y migración de células, detiene el ciclo celular y causa autofagia (Wang et al., 2012; Chen et al., 2021).

El Taraxerol presenta actividades de inhibición del desarrollo en células del cáncer de epitelio gástrico (Tan, 2011), glioblastoma en ratones (Hong et al., 2016), cáncer de próstata (Surapaneni, 2019). Estas actividades las lleva a cabo induciendo la apoptosis por medio de un incremento en los niveles de caspasas, inhibiendo proteínas asociadas al ciclo celular, induciendo la autofagia, induciendo la fragmentación del ADN, deteniendo el ciclo celular e inhibiendo la migración celular (Tan, 2011; Hong et al., 2016; Surapaneni, 2019).

La Cucurbitacina B, a su vez cuenta con actividades anticancerígenas demostradas en diferentes estudios, en los cuales se mencionan a células del cáncer de mama (Dakeng et al., 2012; Duangmano et al., 2012; Sinha et al., 2016; Ditharot et al., 2019), cáncer de páncreas (Thoen-

nissen et al., 2009; Iwanski et al., 2010; Zhou et al., 2019), leucemia (Li, et al., 2010), carcinoma hepatocelular (Meng, et al., 2010), cáncer de pulmón (Lu et al., 2012), cáncer de próstata (Gao et al., 2014), cáncer de colon (Dandawate et al., 2020) y cáncer de laringe (Liu et al., 2010). Estas actividades anticancerígenas se llevan a cabo mediante la detención del ciclo celular, inhibición del factor de transcripción STAT3, inducción de la apoptosis, control de la metástasis y angiogénesis, inducción de la autofagia e inhibición de la polimerización de microtúbulos (Li, et al., 2010; Duangmano et al., 2010, 2012; Dakeng et al., 2012; Ren et al., 2015).

Los residuos activos involucrados en la estabilización de los complejos fueron la Arg158, la Asn100, la Ile132, la Lys130, la Phe11, la Phe50, la Tyr103 y la Tyr134 quienes participaban en la formación de puentes de hidrógeno e interacciones de contacto como la interacciones de van der Waals entre los residuos y estas moléculas candidatas, dichos residuos se encuentran ubicados en cuatro motivos de reconocimiento de ARN (RRM) que conforman el dominio de unión al ARN de la nucleolina (Tajrishy et al., 2011).

Si bien no se han registrado previamente interacciones de estas moléculas con la NCL, las actividades anticancerígenas mencionadas anteriormente podrían ser beneficiadas por debido a las interacciones que se generarían con la proteína NCL, por la cual podrían ser consideradas candidatas para futuras pruebas y estudios que involucren tanto a las moléculas recomendadas como la proteína NCL.

## CONCLUSIONES

Los resultados hallados en este estudio sugieren que los triterpenos Maytenina, Taraxerol, Cucurbitacina B y Pristimerina fueron los que demostraron mayores afinidades de interacción con el sitio activo DUA de las nucleolinas, pudiendo presentar actividades inhibitorias de las funciones

de la nucleolina. Si bien estos hallazgos computacionales podrían arrojar algunos indicios de las afinidades de estos triterpenos con esta proteína, sin embargo, se recomienda realizar simulaciones exhaustivas de dinámica molecular, así como ensayos experimentales de titulación calorimétrica isotérmica y cristalografía de los complejos.

## **APORTES DE LOS AUTORES**

SG: Elaboración del diseño metodológico del estudio, pruebas y análisis computacional, escritura del artículo científico. EGM: Aportes en el diseño metodológico, aportes en el análisis estadístico de los resultados, aportes en la escritura del artículo científico. LM: Aportes en el diseño del estudio, aportes en la escritura del artículo científico.

## **CONFLICTO DE INTERESES**

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2012). RNA-binding protein nucleolin in disease. *RNA Biology*, 9(6), 799–808. <https://doi.org/10.4161/rna.19718>
- Akhatar, M. S., & Swamy, M. K. (2018). Anticancer plants: Properties and application. In *Anticancer plants: Properties and Application* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8548-2>
- Anwar, T., Kumar, P., & Khan, A. U. (2021). Modern Tools and Techniques in Computer-Aided Drug Design. In *Molecular Docking for Computer-Aided Drug Design* (pp. 1–30). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822312-3.00011-4>
- Arumugam, S., Clarke Miller, M., Maliekal, J., Bates, P. J., Trent, J. O., & Lane, A. N. (2010). Solution structure of the RBD1,2 domains from human nucleolin. *Journal of Biomolecular NMR*, 47(1), 79–83. <https://doi.org/10.1007/s10858-010-9412-1>
- Baig, M. H., Ahmad, K., Rabbani, G., Danishuddin, M., & Choi, I. (2018). Computer Aided Drug Design and its Application to the Development of Potential Drugs for Neurodegenerative Disorders. *Current Neuropharmacology*, 16(6), 740–748. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666171016163510>
- Berman, H., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T., & Weissig, H. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, 28(1), 235–242.
- Bulusu, G., & Desiraju, G. R. (2020). Strong and Weak Hydrogen Bonds in Protein–Ligand Recognition. *Journal of the Indian Institute of Science*, 100(1), 31–41. <https://doi.org/10.1007/s41745-019-00141-9>
- Carvalho, L. S., Gonçalves, N., Fonseca, N. A., & Moreira, J. N. (2021). Cancer Stem Cells and Nucleolin as Drivers of Carcinogenesis. *Pharmaceuticals*, 14(60), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ph14010060>
- Cevatemre, B., Erkisa, M., Aztopal, N., Karakas, D., Alper, P., Tsimplouli, C., Sereti, E., Dimas, K., Armutak, E. I. I., Gurevin, E. G., Uvez, A., Mori, M., Berardozzi, S., Ingallina, C., D'Acquarica, I., Botta, B., Ozpolat, B., & Ulukaya, E. (2018). A promising natural product, pristimerin, results in cytotoxicity against breast cancer stem cells in vitro and xenografts in vivo through apoptosis and an incomplete autophagy in breast cancer. *Pharmacological Research*, 129, 500–514. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.11.027>
- Chan, K. T., Li, K., Liu, S. L., Chu, K. H., Toh, M., & Xie, W. D. (2010). Cucurbitacin B inhibits STAT3 and the Raf/MEK/ERK pathway in leukemia cell line K562. *Cancer Letters*, 289(1), 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.can>

- let.2009.07.015
- Chan, K. T., Meng, F. Y., Li, Q., Ho, C. Y., Lam, T. S., To, Y., Lee, W. H., Li, M., Chu, K. H., & Toh, M. (2010). Cucurbitacin B induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in BEL-7402 human hepatocellular carcinoma cells and is effective via oral administration. *Cancer Letters*, 294(1), 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.01.029>
- Chen, R.-Z., Yang, F., Zhang, M., Sun, Z.-G., & Zhang, N. (2021). Cellular and Molecular Mechanisms of Pristimerin in Cancer Therapy: Recent Advances. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.671548>
- Cheng, S., Zhang, Z., Hu, C., Xing, N., Xia, Y., & Pang, B. (2020). Pristimerin Suppressed Breast Cancer Progression via miR-542-5p/DUB3 Axis. *OncoTargets and Therapy*, Volume 13, 6651–6660. <https://doi.org/10.2147/OTT.S257329>
- Dakeng, S., Duangmano, S., Jiratchariyakul, W., U-Pratya, Y., Bögler, O., & Patmasiriwat, P. (2012). Inhibition of Wnt signaling by cucurbitacin B in breast cancer cells: Reduction of Wnt-associated proteins and reduced translocation of galectin-3-mediated  $\beta$ -catenin to the nucleus. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(1), 49–60. <https://doi.org/10.1002/jcb.23326>
- Dandawate, P., Subramaniam, D., Panovich, P., Standing, D., Krishnamachary, B., Kaushik, G., Thomas, S. M., Dhar, A., Weir, S. J., Jensen, R. A., & Anant, S. (2020). Cucurbitacin B and I inhibits colon cancer growth by targeting the Notch signaling pathway. *Scientific Reports*, 10(1), 1290. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57940-9>
- Deeb, D., Gao, X., Liu, Y. B., Pindolia, K., & Gautam, S. (2014). Pristimerin, a quinone-methide triterpenoid, induces apoptosis in pancreatic cancer cells through the inhibition of pro-survival Akt/NF- $\kappa$ B/mTOR signaling proteins and anti-apoptotic Bcl-2. *International Journal of Oncology*, 44(5), 1707–1715. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2325>
- Dittharot, K., Dakeng, S., Suebsakwong, P., Suksamrarn, A., Patmasiriwat, P., & Promkan, M. (2019). Cucurbitacin B Induces Hypermethylation of Oncogenes in Breast Cancer Cells. *Planta Medica*, 85(05), 370–378. <https://doi.org/10.1055/a-0791-1591>
- Duangmano, S., Dakeng, S., Jiratchariyakul, W., Suksamrarn, A., Smith, D. R., & Patmasiriwat, P. (2010). Antiproliferative Effects of Cucurbitacin B in Breast Cancer Cells: Down-Regulation of the c-Myc/hTERT/Telomerase Pathway and Obstruction of the Cell Cycle. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(12), 5323–5338. <https://doi.org/10.3390/ijms11125323>
- Duangmano, S., Sae-lim, P., Suksamrarn, A., Patmasiriwat, P., & Domann, F. E. (2012). Cucurbitacin B Causes Increased Radiation Sensitivity of Human Breast Cancer Cells via G2/M Cell Cycle Arrest. *Journal of Oncology*, 2012, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/601682>
- Ferreira de Freitas, R., & Schapira, M. (2017). A systematic analysis of atomic protein–ligand interactions in the PDB. *MedChemComm*, 8(10), 1970–1981. <https://doi.org/10.1039/C7MD00381A>
- Fricker, P., Gastreich, M., & Rarey, M. (2004). Automated Generation of Structural Molecular Formulas under Constraints. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 44, 1065–1078.
- Gao, Y., Islam, M. S., Tian, J., Lui, V. W. Y., & Xiao, D. (2014). Inactivation of ATP citrate lyase by Cucurbitacin B: A bioactive compound from cucumber, inhibits prostate cancer growth. *Cancer Letters*, 349(1), 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.03.015>
- Gill, B. S., Kumar, S., & Navgeet. (2016). Triterpenes in cancer: significance and their influence. *Molecular Biology Reports*, 43(9), 881–896. <https://doi.org/10.1007/s11033-016->

- 4032-9
- Guedes, I. A., de Magalhães, C. S., & Dardenne, L. E. (2013). Receptor-ligand molecular docking. *Biophysical Reviews*, 6(1), 75–87. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0130-2>
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST : Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontologia Electronica*, 4(1), 9.
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(1), 1–17.
- Hernandes, C., Miguita, L., de Sales, R. O., Silva, E. de P., Mendonça, P. O. R. de, Lorencini da Silva, B., Klingbeil, M. de F. G., Mathor, M. B., Rangel, E. B., Marti, L. C., Coppede, J. da S., Nunes, F. D., Pereira, A. M. S., & Severino, P. (2020). Anticancer Activities of the Quinone-Methide Triterpenes Maytenin and 22-β-hydroxymaytenin Obtained from Cultivated *Maytenus ilicifolia* Roots Associated with Down-Regulation of miRNA-27a and miR-20a/miR-17-5p. *Molecules*, 25(3), 760. <https://doi.org/10.3390/molecules25030760>
- Hong, J. F., Song, Y. F., Liu, Z., Zheng, Z. C., Chen, H. J., & Wang, S. S. (2016). Anticancer activity of taraxerol acetate in human glioblastoma cells and a mouse xenograft model via induction of autophagy and apoptotic cell death, cell cycle arrest and inhibition of cell migration. *Molecular Medicine Reports*, 13(6), 4541–4548. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5105>
- Irvine, J. E., & Freyre, R. H. (1959). Source Materials for Rotenone, Occurrence of Rotenoids in Some Species of the Genus Tephrosia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7(2), 106–107. <https://doi.org/10.1021/jf60096a002>
- Iwanski, G. B., Lee, D. H., En-Gal, S., Doan, N. B., Castor, B., Vogt, M., Toh, M., Bokemeyer, C., Said, J. W., Thoennissen, N. H., & Koefler, H. P. (2010). Cucurbitacin B, a novel in vivo potentiator of gemcitabine with low toxicity in the treatment of pancreatic cancer. *British Journal of Pharmacology*, 160(4), 998–1007. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00741.x>
- Jäger, S., Trojan, H., Kopp, T., Laszczyk, M. N., & Scheffler, A. (2009). Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules*, 14(6), 2016–2031. <https://doi.org/10.3390/molecules14062016>
- Kacprzak, M. K. (2013). Chemistry and Biology of Cinchona Alkaloids. In K. G. Ramawat & J. M. Mérillon (Eds.), *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* (pp. 1–4242). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6>
- Kaufman, P. B., Duke, J. A., Brielmann, H., Boik, J., & Hoyt, J. E. (1997). A Comparative Survey of Leguminous Plants as Sources of the Isoflavones, Genistein and Daidzein: Implications for Human Nutrition and Health. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 3(1), 7–12. <https://doi.org/10.1089/acm.1997.3.7>
- Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E., Chen, J., Fu, G., & Gindulyte, A. (2016). PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res*, 1, 1202–1213.
- Lee, J. S., Yoon, I. S., Lee, M. S., Cha, E. Y., Thuong, P. T., Diep, T. T., & Kim, J. R. (2013). Anticancer Activity of Pristimerin in Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive SKBR3 Human Breast Cancer Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36(2), 316–325. <https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00685>
- Lee, S.-O., Kim, J.-S., Lee, M.-S., & Lee, H.-J. (2016). Anti-cancer effect of pristimerin by



- inhibition of HIF-1 $\alpha$  involves the SPHK-1 pathway in hypoxic prostate cancer cells. *BMC Cancer*, 16(1), 701. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2730-2>
- Li, J., Guo, Q., Lei, X., Zhang, L., Su, C., Liu, Y., Zhou, W., Chen, H., Wang, H., Wang, F., Yan, Y., & Zhang, J. (2020). Pristimerin induces apoptosis and inhibits proliferation, migration in H1299 Lung Cancer Cells. *Journal of Cancer*, 11(21), 6348–6355. <https://doi.org/10.7150/jca.44431>
- Liao, J., Wu, F., Lin, W., & Huang, Z. (2018). Taraxerol exerts potent anticancer effects via induction of apoptosis and inhibition of Nf-Kb signalling pathway in human middle ear epithelial cholesteatoma cells. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 17(6), 1011–1017. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v17i6.5>
- Liu, T., Peng, H., Zhang, M., Deng, Y., & Wu, Z. (2010). Cucurbitacin B, a small molecule inhibitor of the Stat3 signaling pathway, enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell carcinoma cells to cisplatin. *European Journal of Pharmacology*, 641(1), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.04.062>
- Lu, P., Yu, B., & Xu, J. (2012). Cucurbitacin B Regulates Immature Myeloid Cell Differentiation and Enhances Antitumor Immunity in Patients with Lung Cancer. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 27(8), 495–503. <https://doi.org/10.1089/cbr.2012.1219>
- Mu, X.-M., Shi, W., Sun, L.-X., Li, H., Wang, Y.-R., Jiang, Z.-Z., & Zhang, L.-Y. (2012). Pristimerin Inhibits Breast Cancer Cell Migration by Up-regulating Regulator of G Protein Signaling 4 Expression. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(4), 1097–1104. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.4.1097>
- Oberlies, N. H., Burgess, J. P., Navarro, H. A., Pinos, R. E., Soejarto, D. D., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Wani, M. C., & Wall, M. E. (2001). Bioactive Constituents of the Roots of *Licania inrapetiolaris*. *Journal of Natural Products*, 64(4), 497–501. <https://doi.org/10.1021/np0005006>
- Park, J.-H., & Kim, J.-K. (2018). Pristimerin, a naturally occurring triterpenoid, attenuates tumorigenesis in experimental colitis-associated colon cancer. *Phytomedicine*, 42, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.03.033>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, 30(1), 70–82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>
- Ren, G., Sha, T., Guo, J., Li, W., Lu, J., & Chen, X. (2015). Cucurbitacin B induces DNA damage and autophagy mediated by reactive oxygen species (ROS) in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Natural Medicines*, 69(4), 522–530. <https://doi.org/10.1007/s11418-015-0918-4>
- Ringuelet, J., & Viña, S. (2013). *Productos Naturales Vegetales* (1a ed.). Universidad Nacional de la Plata.
- Sinha, S., Khan, S., Shukla, S., Lakra, A. D., Kumar, S., Das, G., Maurya, R., & Meeran, S. M. (2016). Cucurbitacin B inhibits breast cancer metastasis and angiogenesis through VEGF-mediated suppression of FAK/MMP-9 signaling axis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 77, 41–56. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.05.014>
- Sterand, K., Maaß, P., & Rarey, M. (2006). Complexes at a Glance: Automated Generation of two-dimensional Complex Diagrams. *Molecular Bioinformatics*, 22, 1710–1716.



- Suárez, A. I., Chavez, K., Mateu, E., Compagnone, R. S., Muñoz, A., Sojo, F., Arvelo, F., Mijares, M., & De Sanctis, J. B. (2009). Cytotoxic Activity of seco -Entkaurenes from *Croton caracasana* on Human Cancer Cell Lines. *Natural Product Communications*, 4(11), 1934578X0900401. <https://doi.org/10.1177/1934578X0900401117>
- Surapaneni, S. (2019). *Apoptosis of LNCaP and PC-3 cell lines and testosterone-induced prostate cancer by taraxerol and reticulatin isolated from Annona reticulata l.* (Vol. 1, Issue 1). ABMRCP.
- Tajrishi, M. M., Tuteja, R., & Tuteja, N. (2011). Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Communicative and Integrative Biology*, 4(3), 267–275. <https://doi.org/10.4161/cib.4.3.14884>
- Takasaki, M., Konoshima, T., Tokuda, H., Masuda, K., Arai, Y., Shiojima, K., & Ageta, H. (1999). Anti-carcinogenic Activiti of Taraxacum Plant. II. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 22(6), 606–610.
- Tallamy, D. W., Hibbard, B. E., Clark, T. L., & Gillespie, J. J. (2005). Western Corn Rootworm, Cucurbits and Cucurbitacins Purported Origin of Western Corn Rootworm. In S. Vidal, B. E. Hibbard, T. L. Clark, & J. J. Gillespie (Eds.), *Western Corn Rootworm: Ecology and Management* (pp. 67–94). CAB Internarional.
- Tan, B. (2011). Effects of taraxerol and taraxeryl acetate on cell cycle and apoptosis of human gastric epithelial cell line AGS. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 9(6), 638–642. <https://doi.org/10.3736/jcim20110610>
- Thoennissen, N. H., Iwanski, G. B., Doan, N. B., Okamoto, R., Lin, P., Abbassi, S., Song, J. H., Yin, D., Toh, M., Xie, W. D., Said, J. W., & Koeffler, H. P. (2009). Cucurbitacin B Induces Apoptosis by Inhibition of the JAK/STAT Pathway and Potentiates Antiproliferative Effects of Gemcitabine on Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Research*, 69(14), 5876–5884. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0536>
- Thomas, C. M., Wood, R. C., Wyatt, J. E., Pendleton, M. H., Torrenegra, R. D., Rodriguez, O. E., Harirforoosh, S., Ballester, M., Lightner, J., Krishnan, K., & Ramsauer, V. P. (2012). Anti-neoplastic activity of two flavone isomers derived from *Gnaphalium elegans* and *achyrocline bogotensis*. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039806>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Volkamer, A., Kuhn, D., Grombacher, T., Rippmann, F., & Rarey, M. (2012). Combining global and local measures for structure-based druggability predictions. *J. Chem. Inf. Model.*, 52, 360–372.
- Wang, Y., Zhou, Y., Zhou, H., Jia, G., Liu, J., Han, B., Cheng, Z., Jiang, H., Pan, S., & Sun, B. (2012). Pristimerin Causes G1 Arrest, Induces Apoptosis, and Enhances the Chemosensitivity to Gemcitabine in Pancreatic Cancer Cells. *PLoS ONE*, 7(8), e43826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043826>
- Wink, M. (2015). Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines*, 2, 251–286. <https://doi.org/10.3390/medicines2030251>
- Yang, H., Landis-Piwowar, K. R., Lu, D., Yuan, P., Li, L., Reddy, G. P.-V., Yuan, X., & Dou, Q. P. (2008). Pristimerin induces apoptosis by targeting the proteasome in prostate cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103(1), 234–244. <https://doi.org/10.1002/jcb.21399>
- Yao, X., Lu, B., Lü, C., Bai, Q., Yan, D., & Xu, H. (2017). Taraxerol Induces Cell Apoptosis through A Mitochondria-Mediated Pathway

- in HeLa Cells. *Cell Journal*, 19(3), 512–519. <https://doi.org/10.22074/cellj.2017.4543>.
- Yin, M. C. (2012). Anti-glycative potential of triterpenes: A mini-review. In *BioMedicine (Netherlands)* (Vol. 2, Issue 1, pp. 2–9). No longer published by Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biomed.2011.12.001>
- Yousef, B. A., Hassan, H. M., Guerram, M., Hamdi, A. M., Wang, B., Zhang, L.-Y., & Jiang, Z.-Z. (2016). Pristimerin inhibits proliferation, migration and invasion, and induces apoptosis in HCT-116 colorectal cancer cells. *Bio-medicine & Pharmacotherapy*, 79, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.02.003>
- Zafar, R., & Sharma, K. (2015). Occurrence of taraxerol and taraxasterol in medicinal plants. *Pharmacognosy Reviews*, 9(17), 19. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.156317>
- Zhao, Q., Bi, Y., Guo, J., Liu, Y., Zhong, J., Liu, Y., Pan, L., Guo, Y., Tan, Y., & Yu, X. (2021). Effect of pristimerin on apoptosis through activation of ROS/ endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated noxa in colorectal cancer. *Phytomedicine*, 80, 153399. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153399>
- Zhao, Q., Liu, Y., Zhong, J., Bi, Y., Liu, Y., Ren, Z., Li, X., Jia, J., Yu, M., & Yu, X. (2019). Pristimerin induces apoptosis and autophagy via activation of ROS/ASK1/JNK pathway in human breast cancer in vitro and in vivo. *Cell Death Discovery*, 5(1), 125. <https://doi.org/10.1038/s41420-019-0208-0>
- Zhou, J., Liu, M., Chen, Y., Xu, S., Guo, Y., & Zhao, L. (2019). Cucurbitacin B suppresses proliferation of pancreatic cancer cells by ceRNA: Effect of miR-146b-5p and lncRNA-AFAP1-AS1. *Journal of Cellular Physiology*, 234(4), 4655–4667. <https://doi.org/10.1002/jcp.27264>