

Artículo original

## Evaluación computacional de las interacciones de compuestos naturales y el dominio unión al ARN de las nucleolinas utilizando acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular

### Computational evaluation of the interactions of natural compounds with the RNA binding domain of nucleolins using molecular docking and molecular dynamics simulations

Elvio Gayozo-Melgarejo<sup>1,\*</sup>, Laura Rojas-Aguadé<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay

**Citación:** Gayozo-Melgarejo E, Rojas-Aguadé L. Evaluación computacional de las interacciones de compuestos naturales y el dominio unión al ARN de las nucleolinas utilizando acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 47(183):385-399, abril-junio de 2023. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefn.1830>

**Editor:** Luis Fernando Echeverri

**\*Correspondencia:**

Elvio Gayozo-Melgarejo;  
elviologo@gmail.com

**Recibido:** 1 de diciembre de 2022

**Aceptado:** 2 de junio de 2023

**Publicado en línea:** 16 de junio de 2023



Este artículo está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional

## Resumen

Varios estudios proponen la nucleolina como un blanco alternativo para la búsqueda y el diseño de nuevas terapias antitumorales o anticancerígenas. El objetivo de este estudio fue evaluar compuestos con potenciales afinidades de unión al ARN de las nucleolinas mediante herramientas bioinformáticas. Se evaluaron diez compuestos de los cuales tres moléculas (ácido betulínico, triptolide y berberina) presentaron afinidades de interacción con el dominio de unión al ARN (*RNA binding domain*, RBD), exhibiendo valores de energía de unión significativamente favorables ( $p < 0,05$ ) y una constante de disociación calculada ( $K_{d \text{ calc}}$ ) entre 0,14 y 0,91  $\mu\text{M}$ . Las simulaciones de dinámica molecular evidenciaron que únicamente el complejo nucleolina-berberina tuvo estabilidad de interacción y energía libre de unión favorable en el tiempo simulado. Los residuos involucrados en la formación del complejo eran aminoácidos que cumplen funciones importantes en el sitio activo. Los hallazgos sugieren que, entre los compuestos evaluados, la berberina tuvo resultados favorables como potencial inhibidor de las actividades de la nucleolina, específicamente del dominio RBD.

**Palabras clave:** Bioinformática; Berberina; Cáncer; *in silico*; Nucleolinas; Productos naturales.

## Abstract

Nucleolin has been proposed as an alternative target to search for and design possible new antitumor or anticancer therapies. Our objective was to evaluate compounds with potential binding affinities to the RNA binding domain (RBD) of nucleolins using bioinformatics tools. Ten compounds were evaluated of which three molecules (betulinic acid, triptolide, and berberine) showed binding affinities to the RBD domain with significantly favorable ( $p < 0.05$ ) binding energy values and calculated dissociation constant ( $K_{d \text{ calc}}$ ) between 0.14-0.91  $\mu\text{M}$ . Molecular dynamics simulations evidenced that only the nucleolin-berberine complex exhibited interaction stability and favorable binding free energy in the simulated time. The residues involved in the complex formation were amino acids that play important roles in the active site. These findings suggest that among the evaluated compounds, berberine showed favorable results as a potential inhibitor of nucleolin activities, specifically in the RBD domain.

**Keywords:** Bioinformatics; Berberine; Cancer; *in silico*; Nucleolins; Natural products.

## Introducción

Los productos naturales han demostrado ser fuentes importantes de compuestos con actividad inhibitoria de proteínas y potencial anticancerígeno. Muchos, como el curcumol, están en la mira de los investigadores para su desarrollo farmacológico (Wang *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2019), y muchos otros, como el paclitaxel, la camptotecina y nuevos derivados de la colchicina, ya se emplean farmacológicamente (Berrada *et al.*, 2005; Howat *et al.*, 2014; Johnson *et al.*, 2017).

Muchos de los compuestos naturales con posibles aplicaciones anticancerígenas interactúan con blancos moleculares proteicos e inhiben sus funciones y actividades (Pan *et al.*, 2012; Khazir *et al.*, 2014). Recientemente, se ha evaluado la nucleolina como blanco terapéutico en la búsqueda y desarrollo de moléculas inhibitoras o reguladoras de su expresión en células tumorales (Watanabe *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2011; Chen & Xu, 2016; Wang *et al.*, 2018). Este es el caso del curcumol y la oridonina, en los que se han reportado actividades inhibitorias de nucleolinas en células de carcinoma nasofaríngeo, desencadenando una disminución en la proliferación celular (Wang *et al.*, 2018; Vasaturo *et al.*, 2018).

La nucleolina es la proteína más abundante en los nucléolos (~90 %); cumple funciones importantes como la transcripción y el tráfico del ARNr, la regulación de la estructura de la cromatina y la nucleogénesis, y participa en el ensamblaje de ribosomas (Bugler *et al.*, 1982; Ginisty *et al.*, 1999; Tajrishi *et al.*, 2011; Berger *et al.*, 2015). Sin embargo, en células tumorales presenta una expresión alterada, localizándose abundantemente en el citoplasma y en la superficie celular, por lo que los investigadores correlacionan su sobreexpresión y abundancia con varios tipos de cáncer debido a su intervención en los procesos de proliferación y crecimiento celular (Berger *et al.*, 2015; Chen & Xu, 2016).

Las nucleolinas presentes en la superficie celular son capaces de interrumpir procesos apoptóticos mediante la interacción con ligandos (ácidos nucleicos y proteínas) relacionados con este evento, promoviendo, así, la división descontrolada de células tumorales (Meng *et al.*, 2011, Berger *et al.*, 2015; Chen & Xu, 2016). La disminución de la concentración de esta proteína es capaz de generar la inhibición de la proliferación de células cancerígenas y desencadenar su apoptosis (Meng *et al.*, 2011; Chen & Xu, 2016).

Para contribuir en la selección de moléculas con posibles actividades inhibitorias de las nucleolinas, el objetivo principal de este estudio fue evaluar e identificar compuestos naturales con potencial actividad inhibitoria del RBD de las nucleolinas mediante el análisis de modelos de acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular.

## Materiales y métodos

### *Caracterización de la capacidad farmacofórica del RBD de la nucleolina*

El sitio con capacidades farmacofóricas en el RBD de la nucleolina (PDB: 2KRR) se determinó y se caracterizó empleando las herramientas DoGSiteScorer (Volkamer *et al.*, 2012) y GRASP (Santana *et al.*, 2020). Para ello se establecieron descriptores como las dimensiones del sitio farmacofórico, los grupos funcionales y la composición de residuos presentes, así como el puntaje de capacidad farmacofórica y la predicción de residuos con mayor probabilidad de interacción con ligandos.

### *Pruebas de acoplamiento molecular*

Se hicieron pruebas de acoplamiento molecular entre la nucleolina (PDB: 2KRR) y compuestos naturales que han demostrado propiedades medicinales beneficiosas para el ser humano (Tabla 1). Las estructuras de la proteína y de las moléculas se obtuvieron de las bases de datos Protein Data Bank RCSB (Arumugam *et al.*, 2010; Berman *et al.*, 2000) y PubChem (Kim *et al.*, 2016).

Para la preparación y minimización energética de la estructura de los compuestos y de la nucleolina se emplearon: el algoritmo de campo de fuerza universal (UFF), utilizando cuatro pasos por actualización; el algoritmo de gradientes conjugados, con un ciclo de

50.000 pasos y un criterio de convergencia de  $0,001 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{Å}^{-1}$ , y se añadieron cargas parciales y átomos de hidrógeno polares con un pH fisiológico celular de 7,4 mediante los programas Avogadro (Hanwell *et al.*, 2012) y PyRx 0.8 (Dallakyan & Olson, 2015). Se hicieron pruebas de acoplamiento molecular en diez réplicas y se empleó una caja de interacción con dimensiones de  $43 \times 44 \times 52 \text{ Å}^3$ , con el fin de minimizar el grado de incertidumbre de los ensayos computacionales; estas pruebas se hicieron con el programa AutoDock Vina v.1 (Trott & Olson, 2010). Como control se usó el diterpeno oridonina, la cual ha demostrado su actividad inhibitoria de las nucleolíinas (Vasaturo *et al.*, 2018).

La afinidad de interacción se determinó mediante la estimación de la constante de disociación calculada ( $K_{d \text{ calc}}$ ) en la ecuación 1 (Ec. 1), así como la eficacia del ligando (EL) en la ecuación 2 (Ec. 2); para ello se emplearon las ecuaciones utilizadas por Choudhury *et al.* (2021) y Onawole *et al.* (2018), respectivamente:

$$Kd \text{ calc} = e^{\left(\frac{\Delta G \times 1000}{RT}\right)} \dots\dots\dots \text{Ec.1}$$

$$EL = \frac{-\Delta G}{HA} \dots\dots\dots \text{Ec. 2,}$$

donde T es la temperatura corporal de 310 K (37 °C), R es la constante de los gases ideales con valor de  $1,987207 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$  y HA es el número de átomos pesados presentes en la estructura química del ligando (Hopkins *et al.*, 2014; Onawole *et al.*, 2018; Choudhury *et al.*, 2021).

Se seleccionaron aquellos compuestos con valores de energía libre de unión ( $\Delta G$ ) significativamente favorables y valores de  $K_{d \text{ calc}}$  menores a los registrados con el control, para su análisis y visualización.

La visualización, análisis y caracterización de los complejos resultantes de la interacción de los compuestos seleccionados y el RBD de las nucleolíinas, se hicieron con el programa Discovery Studio Visualizer v.20 (Dassault Systèmes BIOVIA, 2019).

### Simulaciones de dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular se hicieron por triplicado para disminuir los errores y el grado de incertidumbre generados durante la determinación de la estabilidad de los complejos y la energía libre de interacción de los ligandos en el tiempo simulado; para ello se emplearon los programas NAnoscale Molecular Dynamics 2.14 (Phillips *et al.*, 2005) y Visual Molecular Dynamics 1.9.4a53 (Humphrey *et al.*, 1996).

En las simulaciones se emplearon los parámetros de campo de fuerza del programa CHARMM36 (Vanommeslaeghe *et al.*, 2010); los datos topológicos de los compuestos se generaron con la herramienta Ligand Reader & Modeler (Jo *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2017) de CHARMM-GUI (Brooks *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2016). Los complejos seleccionados se sometieron a solvatación con moléculas de agua ( $\text{H}_2\text{O}$  TIP3P) (Jorgensen *et al.*, 1983), y para neutralizar las cargas parciales del sistema, se agregaron iones cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) e iones sodio ( $\text{Na}^+$ ). A cada complejo se le aplicó una minimización energética empleando el método del gradiente de descenso más pronunciado para un máximo de 50.000 pasos; posteriormente, cada complejo fue restringido empleando un ensamble isotérmico-isobárico (NPT) por 100 ps. Las simulaciones se hicieron a una temperatura de 310 K empleando el esquema de termostato de Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984) y a una presión de 1,02 bares al emplear el esquema de baróstato de Parrinello-Rahman (Parrinello & Rahman, 1980). Se utilizó el valor de 1 como constante dieléctrica del solvente; las simulaciones se realizaron durante 10 ns con intervalos de 2 fs y un periodo de oscilación de 150 fs, y las velocidades se determinaron según la distribución de Maxwell.

Como parámetros de estabilidad de la interacción se estimaron la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD), la raíz de la fluctuación cuadrática media (RMSF), la variación de la raíz de la fluctuación cuadrática media ( $\Delta\text{RMSF}$ ), el área de superficie accesible al solvente (SASA), y el número de puentes de hidrógeno existente entre la proteína y los compuestos y en todo el complejo, empleando el programa Visual Molecular Dynamics 1.9.4a53 (Humphrey *et al.*, 1996). La energía de Gibbs se determinó para cada complejo

mediante el método de energía de interacción lineal (EIL) (Åqvist *et al.*, 1994; Hansson *et al.*, 1998), empleando el programa CaFE (Liu & Hou, 2016) y los coeficientes  $\alpha=0,18$ ,  $\beta=0,5$ ,  $\gamma=0$  (De Amorim *et al.*, 2008; Hansson *et al.*, 1998).

#### Análisis de datos

Las predicciones de ajuste a la regla modificada de los cinco de Lipinski (peso molecular  $\leq 500$  g.mol<sup>-1</sup>, coeficiente de participación agua:octanol de Moriguchi  $\leq 4,15$ , aceptores de puentes de hidrógeno  $\leq 10$ , donadores de puentes de hidrógeno  $\leq 5$ ) (Lipinski *et al.*, 2001) de los compuestos, se realizaron con la herramienta SwissADME (Daina *et al.*, 2014; Daina & Zoete, 2016; Daina *et al.*, 2017). Los datos de la energía libre de interacción obtenidos en las pruebas de acoplamiento molecular se analizaron mediante el test de Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis, 1952) y el test *post-hoc* de Dunn (Dunn, 1964), en ambos casos con un 5 % de nivel de significación, empleando el programa PAST v. 4.10 (Hammer *et al.*, 2001).

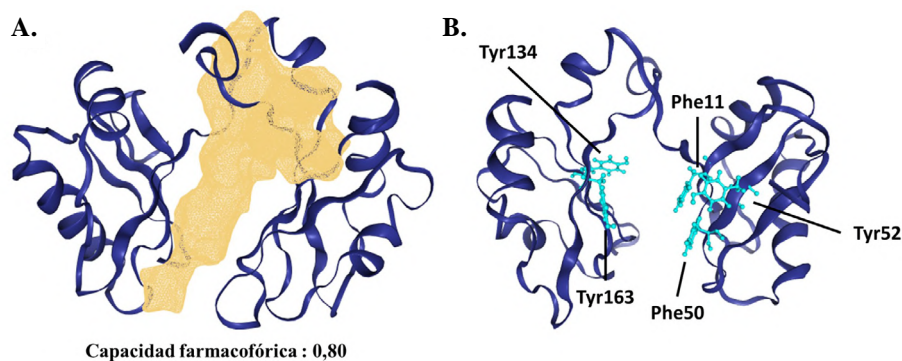
## Resultados

El análisis de la capacidad farmacofórica del RBD reveló la presencia de un sitio altamente farmacofórico con un puntaje de 0,80, valor que sugiere que este dominio presenta aptitudes fisicoquímicas para dirigir la detección o el diseño de posibles inhibidores (Volkamer *et al.*, 2012). Las dimensiones del sitio fueron de 1774,85 Å<sup>3</sup> de volumen, 2524 Å<sup>2</sup> de superficie y 28,36 Å de profundidad (Figura 1).

Se demostró la presencia de un total de 37 grupos funcionales capaces de actuar como donadores en puentes de hidrógeno y 94 grupos capaces de ser aceptores en puentes de hidrógeno; también se registró una hidrofobicidad del 52 % en el sitio, con un total de 140 grupos funcionales capaces de generar interacciones hidrofóbicas.

La composición de residuos del sitio reveló la presencia de un 28 % de residuos polares, 28 % de residuos apolares, 25 % de residuos básicos y 19 % de residuos ácidos con los siguientes aminoácidos: Phe11, Val12, Gly13, Asn14, Asn16, Phe17, Lys49, Phe50, Tyr52, Asn75, Lys78, Glu80, Lys81, Pro82, Lys83, Gly84, Lys85, Asp86, Lys88, Lys89, Arg91, Asp92, Ala93, Arg94, Thr95, Leu96, Leu97, Lys99, Glu119, Ile120, Arg121, Lys130, Ile132, Tyr134, Ile135, Glu136, Glu140, Glu144, Phe147, Glu148, Gln151, Leu162, Tyr163, Tyr164, Thr165, Gly166, Glu167, Pro168, Lys169, Gly170, Glu171, Gly172 y Leu173. El análisis llevado a cabo con algoritmos de aprendizaje de máquina evidenció que los residuos con mayor probabilidad de participación en interacciones con los ligandos fueron: Phe11, Phe50, Tyr52, Tyr134 y la Tyr163 (Figura 1).

Las pruebas de acoplamiento molecular revelaron que el ácido betulínico, la berberina y el triptolide presentaron valores significativamente favorables ( $p<0,05$ ) de energía libre de interacción con el RBD comparados con el control (Tabla 1). Estos compuestos también demostraron una disminución en la constante de disociación estimada ( $K_{d\text{ calc}}$ ) de



**Figura 1.** Análisis de la capacidad farmacofórica del RBD de la nucleolina (PDB: 2KRR), sitio farmacofórico (A), residuos con mayor probabilidad de actividad (B)

cada complejo en comparación con el control ( $K_{d\text{calc}} = 0,14 \pm 0,01$ ,  $0,52 \pm 0,025$  y  $0,91 \pm 0,07$   $\mu\text{M}$ , respectivamente), así como valores óptimos ( $\leq 0,3$ ) de eficacia del ligando ( $\text{EL} = 0,2$ ,  $0,3$  y  $0,3$   $\text{kcal.mol}^{-1}.\text{átom.pes.}^{-1}$ , respectivamente) (Hopkins *et al.*, 2014; Onawole *et al.*, 2018), por lo que fueron seleccionados para analizarlos en las simulaciones de dinámica molecular (Tabla 1).

Las demás moléculas demostraron valores de energía libre de unión y de constante de disociación mayores a lo detectado en el control, lo que sugiere una interacción desfavorable con la nucleolina. El complejo nucleolina-ácido betulínico registró valores de energía libre de unión de  $-9,73 \pm 0,04$   $\text{kcal.mol}^{-1}$  (Tabla 1). Se detectaron interacciones hidrofóbicas entre cadenas de alquilo del ácido betulínico y el residuo Ile132 e interacciones entre orbitales sigma del ácido betulínico y orbitales pi del residuo Phe50 (Figura 2A).

El complejo formado entre la berberina y la nucleolina reveló valores de energía libre de unión de  $-8,91 \pm 0,03$   $\text{kcal.mol}^{-1}$  (Tabla 1). Presentó puentes de hidrógeno con los residuos Lys49 y Tyr134, así como interacciones no convencionales entre átomos de carbono polarizados e hidrógeno con los residuos Glu80 y Lys81. También se identificaron interacciones entre orbitales pi de la berberina y cadenas de alquilo de los residuos Leu97 e Ile132, así como interacciones hidrofóbicas entre grupos alquilo del ligando y los residuos Lys49 y Lys83 (Figura 2B).

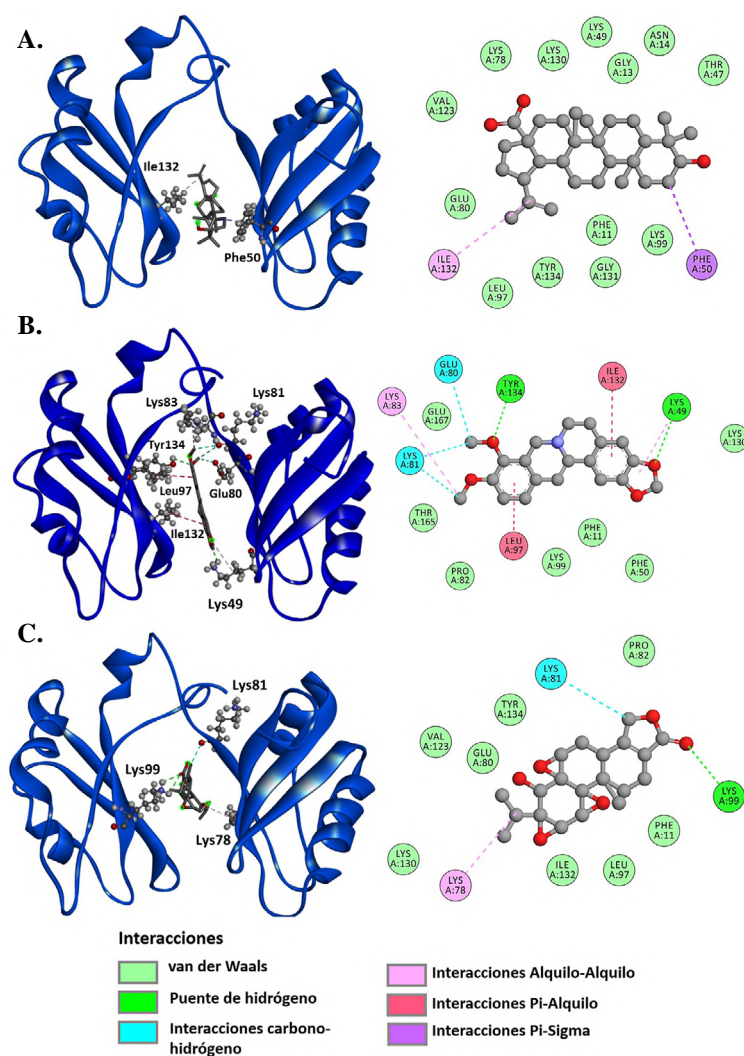
El complejo nucleolina-triptolide reveló valores de energía libre de unión de  $-8,57 \pm 0,05$   $\text{kcal.mol}^{-1}$  (Tabla 1). Se registró la formación de puentes de hidrógeno entre el ligando y el residuo Lys99; también se determinó la formación de interacciones del tipo carbono-hidrógeno con el residuo Lys81, así como interacciones hidrofóbicas entre grupos alquilo del triptolide y el residuo Lys78 (Figura 2C). Las afinidades registradas por los residuos de lisina se deben principalmente a la presencia de átomos de oxígeno electronegativos en el triptolide; también se sabe que es capaz de generar interacciones hidrofóbicas y de van Der Waals debido a su naturaleza lipofílica (Liu *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2019).

Las simulaciones de dinámica molecular realizadas con los complejos seleccionados (nucleolina-ácido betulínico, nucleolina-berberina, nucleolina-triptolide) revelaron una mayor estabilidad, principalmente en el complejo nucleolina-berberina, el cual demostró en el tiempo simulado un promedio menor de RMSD, con un valor de  $4,60 \pm 0,57$  Å (Figura 3A). Sin embargo, los complejos nucleolina-ácido betulínico y nucleolina-triptolide presentaron mayores promedios de RMSD, con valores de  $6,89 \pm 2,06$  y  $6,90 \pm 2,08$  Å, respectivamente.

**Tabla 1.** Energía libre de unión ( $\Delta G$ ) y constante de disociación ( $K_{d\text{calc}}$ ) y eficacia del ligando (EL) en las pruebas de acoplamiento molecular

Compuestos	PubChem CID	$\Delta G$ unión ( $\text{kcal.mol}^{-1}$ )	$K_{d\text{calc}}$ ( $\mu\text{M}$ )	EL ( $\text{kcal.mol}^{-1}.\text{átom.pes.}^{-1}$ )
Oridonina <sup>a</sup>	5321010	$-8,56 \pm 0,14$	$0,94 \pm 0,22$	0,2
Ácido betulínico	64971	$-9,73 \pm 0,04^{***}$	$0,14 \pm 0,01$	0,2
Emodina	10207	$-7,69 \pm 0,03$	$3,79 \pm 0,21$	0,3
Berberina	2353	$-8,91 \pm 0,03^{***}$	$0,52 \pm 0,025$	0,3
Colchicina	6167	$-8,17 \pm 0,17$	$1,81 \pm 0,68$	0,2
Curcumina	969516	$-7,6 \pm 0,31$	$4,57 \pm 2,02$	0,2
Genisteína	5280961	$-7,67 \pm 0,17$	$4,05 \pm 1,17$	0,3
Noscapina	275196	$7,83 \pm 0,18$	$3,11 \pm 0,71$	0,2
Partenolida	6473881	$-7,29 \pm 0,12$	$7,37 \pm 1,45$	0,4
Resveratrol	445154	$-6,97 \pm 0,05$	$12,22 \pm 0,99$	0,4
Triptolide	107985	$-8,57 \pm 0,05^{***}$	$0,91 \pm 0,07$	0,3

<sup>a</sup> Control; átom.pes.: átomo pesado; \*\*\*  $p < 0,001$



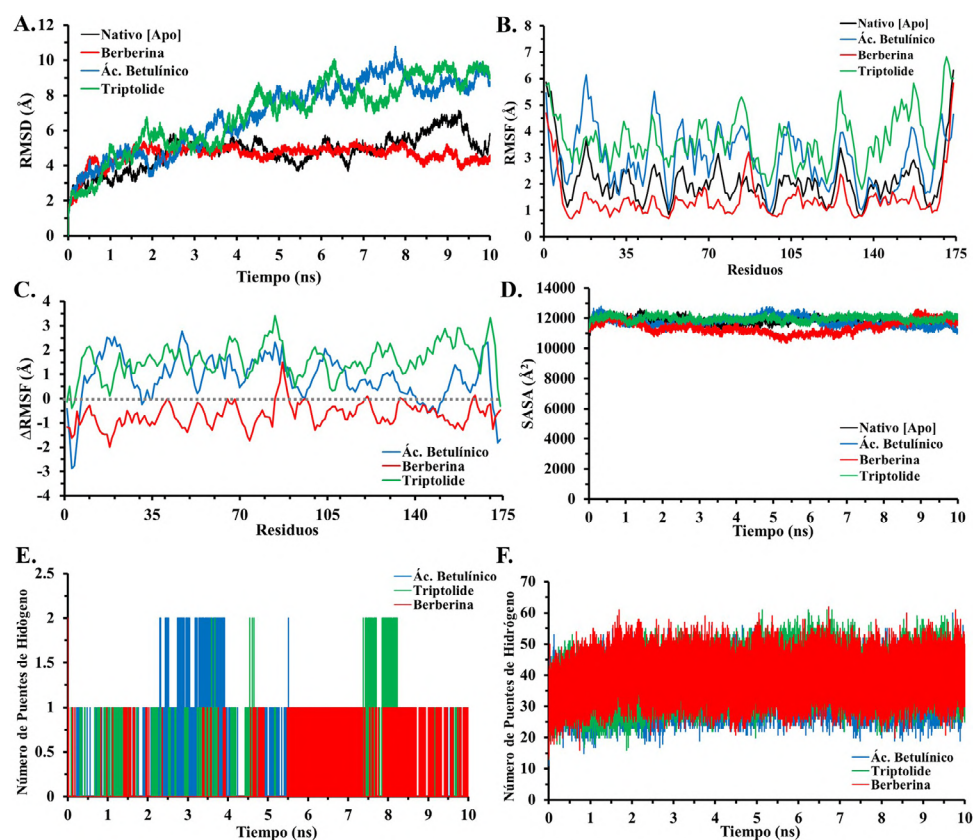
**Figura 2.** Representaciones tridimensionales y bidimensionales de los complejos ligando-proteína seleccionados: complejo nucleolina-ácido betulínico (A), complejo nucleolina-berberina (B), complejo nucleolina-triptolide (C)

Se registraron fluctuaciones en residuos presentes en las regiones Asp36-Thr47, Phe50-Asp60, Gly84-Asn100, Tyr134-Thr139, y Leu162-Thr165, dándose las mayores principalmente en el residuo Lys88 del complejo nucleolina-berberina en comparación con lo detectado en la proteína en su forma nativa (sin ligandos) (**Figura 3B, C**).

Los valores de superficie accesible al solvente (SASA) tuvieron un ligero aumento en el complejo nucleolina-triptolide, con un promedio de  $11983,15 \pm 169,31 \text{ \AA}^2$ . Sin embargo, se registraron promedios similares de SASA en los complejos nucleolina-berberina y nucleolina-ácido betulínico, con valores de  $11399,89 \pm 401,45 \text{ \AA}^2$  y  $11776,86 \pm 312,22 \text{ \AA}^2$ , respectivamente (**Figura 3D**). Estos valores sugieren un mayor acceso del solvente en la nucleolina debido a la presencia de los compuestos en el sitio activo.

El análisis del número de puentes de hidrógeno presentes en los complejos entre los ligandos y la nucleolina reveló la presencia de dos puentes de hidrógeno en el complejo nucleolina-berberina durante todo el tiempo simulado, observándose un aumento en su frecuencia después de los 5 ns de simulación (**Figura 3E**).

En el complejo nucleolina-triptolide se detectó la presencia constante de puentes de hidrógeno entre la molécula y la proteína durante el tiempo simulado.



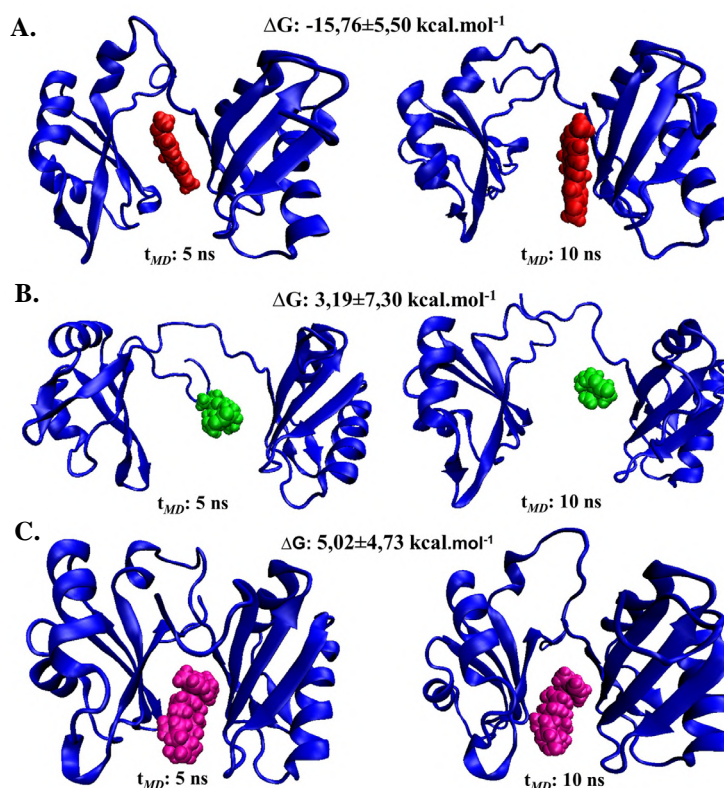
**Figura 3.** Simulaciones de dinámica molecular de los complejos seleccionados: raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) (A), raíz de la fluctuación cuadrática media (RMSF) (B), variación de la raíz de la fluctuación cuadrática media ( $\Delta$ RMSF) (C), superficie accesible al solvente (SASA) (D), número de puentes de hidrógeno formado entre compuestos y la nucleolina (E), número de puentes de hidrógeno totales (F). Ác.: ácido

Por su parte el complejo nucleolina-ácido betulínico reveló la presencia de puentes de hidrógeno entre el ligando y la proteína durante 7 ns de simulación; el número de interacciones decayó después de este tiempo (Figura 3E). Se pudo apreciar la formación de un número de 13 a 62 puentes de hidrógeno en todo el complejo nucleolina-berberina, siendo este el que presentó un mayor número de puentes de hidrógeno; se registraron 13 a 61 puentes de hidrógeno en todo el complejo nucleolina-triptolide, y entre 11 y 60 en todo el complejo nucleolina-ácido betulínico (Figura 3F).

El cálculo de la energía Gibbs de la interacción ( $\Delta G$ ) de los complejos seleccionados reveló resultados favorables solo en el complejo formado entre la berberina y la nucleolina, con valores promedio de  $-15,76 \pm 5,50$  kcal.mol<sup>-1</sup>. Esto también se pudo constatar en los valores promedio de RMSD, RMSF y SASA, los cuales ofrecen información sobre la estabilidad de los complejos proteína-ligando.

El análisis del total de las trayectorias obtenidas en la simulación demostró que la berberina se mantiene dentro del sitio activo sin presentar grandes cambios en la estructura de la nucleolina (Figura 4A). Sin embargo, los complejos conformados por la nucleolina-ácido betulínico y la nucleolina-triptolide demostraron valores desfavorables de energía libre de unión en el tiempo simulado, con valores de  $5,02 \pm 4,73$  y  $3,19 \pm 7,30$  kcal.mol<sup>-1</sup>, respectivamente.

El análisis de la regla de Lipinski de los compuestos demostró que sólo la molécula de ácido betulínico presentó una infracción a la regla, con un valor de coeficiente de partición octanol-agua de Moriguchi de 5,82, mayor a lo recomendado por la regla (Tabla 2).



**Figura 4.** Trayectorias de las simulaciones de dinámica molecular de los complejos seleccionados: complejo nucleolina-berberina (A), complejo nucleolina-triptolide (B), complejo nucleolina-ácido betulínico (C).  $t_{MD}$ : tiempo de simulación.

**Tabla 2.** Evaluación del ajuste de los compuestos a la regla modificada de los cinco de Lipinski

Compuestos	PM <sup>a</sup>	Aceptores de PH	Donadores de PH	TPSA <sup>b</sup>	MLOGP <sup>c</sup>	Infrac.
Ácido betulínico	456,70	3	2	57,53	5,82	1
Emodina	270,24	5	3	94,83	0,10	0
Berberina <sup>d</sup>	336,36	4	0	40,80	2,19	0
Colchicina	399,44	6	1	83,09	1,02	0
Curcumina	368,38	6	2	93,06	1,47	0
Genisteína	270,24	5	3	90,90	0,52	0
Noscapina	413,42	8	0	75,69	1,69	0
Partenolida	248,32	3	0	38,83	2,47	0
Resveratrol	228,24	3	3	60,69	2,26	0
Triptolide	360,40	6	1	84,12	1,26	0

PH: puentes de hidrógeno, Infrac.: número de infracciones a la regla; <sup>a</sup>PM: peso molecular (g.mol<sup>-1</sup>); <sup>b</sup>Área de superficie polar topológica (Å<sup>2</sup>); <sup>c</sup> Coeficiente de partición octanol-agua de Moriguchi; <sup>d</sup> Berberina en su forma de base.

La regla modificada de los cinco de Lipinski establece que los compuestos deben tener un peso molecular menor a 500 g.mol<sup>-1</sup>, un número menor a 10 grupos funcionales aceptores de puentes de hidrógeno, un número menor a cinco grupos funcionales donadores



de puentes de hidrógeno, y que la molécula presente un valor de coeficiente de partición octanol-agua de Moriguchi menor a 4,15. Estos parámetros permiten estimar o predecir la solubilidad y la permeabilidad de los compuestos como medida de su biodisponibilidad en el organismo (Lipinski *et al.*, 2001; Walters, 2012).

Es importante destacar que todos los compuestos evaluados, excepto las moléculas de emodina, curcumina y genisteína, revelaron valores de TPSA menores a  $90 \text{ \AA}^2$  (Tabla 2). Por lo demás, es importante destacar que los compuestos evaluados demostraron valores dentro de los límites de los parámetros sugeridos por la regla modificada de los cinco de Lipinski empleada en este estudio, excepto la molécula del ácido betulínico, el cual presentó un valor de MLOGP mayor a lo sugerido.

## Discusión

Los análisis de acoplamiento molecular revelaron la formación de tres complejos con valores de energía de interacción significativamente favorables entre el RBD de las nucleolíinas y los compuestos (ácido betulínico, triptolide y berberina).

Entre las interacciones registradas en estos complejos, la unión específica más importante impulsada por la entalpía, presente en  $\sim 67\%$  de los complejos proteína-ligando, son los puentes de hidrógeno. Esta unión ayuda a la orientación del ligando en la proteína blanco, por lo que se encuentra asociada a la distorsión conformacional de los compuestos. También se ha observado que presenta grandes aportes energéticos a la afinidad, de  $\sim 0,25$  a  $40 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , por lo que es una de las interacciones más importantes en la búsqueda y diseño de inhibidores (Zhou *et al.*, 2012). Las interacciones mediadas por átomos de carbono parcialmente polarizados en los puentes de hidrógeno no convencionales, se consideran el segundo tipo de unión más importante que afecta la estructura de las proteínas. Se trata de una unión débil, sin embargo, se encuentra en un 20 a 25 % del total de los puentes de hidrógeno; es, además, uno de los fenómenos más comunes en los complejos proteína-ligando y cumple roles importantes en la afinidad de unión al ligando (Zhou *et al.*, 2012).

Las interacciones hidrofóbicas se consideran débiles con aportes de energía de  $\sim 1,5$  a  $2 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , no obstante, tienen un papel importante en la estabilización energética del ligando en la estructura de la proteína (Patil *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2012). También se ha reportado que existe una correlación entre la afinidad de interacción de los ligandos y las superficies lipofílicas de las proteínas en el sitio activo o de unión, si bien lo más sobresaliente es que las interacciones hidrofóbicas generan la repulsión y el reordenamiento de las moléculas de agua en el sitio activo de las proteínas, por lo que se consideran importantes para el desarrollo de inhibidores (Böhm & Klebe, 1996; Bissantz *et al.*, 2010).

Las interacciones entre orbitales pi del grupo arilos de los aminoácidos son también interacciones hidrofóbicas, que aportan polarizaciones y momentos cuadrúpolos considerables, los cuales dan lugar a la formación de interacciones con un conjunto de opciones geométricas que el ligando puede adoptar para alcanzar la estabilidad energética (Bissantz *et al.*, 2010).

En cuanto a la proteína diana, esta presenta dominios de unión al ARN (RBD) que cumplen funciones claves en procesos celulares como el empaquetamiento y el transporte de moléculas de ARNr en los nucléolos (Arumugam *et al.*, 2010). Además, se ha descrito que la proteína se encuentra involucrada en la proliferación de células cancerígenas bloqueando la apoptosis (Berger *et al.*, 2015). Se ha relacionado la nucleolina con las interacciones Fas-FasL y, por consiguiente, con la vía de inducción apoptótica en células cancerígenas (Wise *et al.*, 2013; Berger *et al.*, 2015). El sitio activo de la nucleolina implicado en la unión con la proteína Fas es el RBD y la formación de esta interacción bloquea directamente la presencia del complejo Fas-FasL, evitando, así, la apoptosis, por lo que la inhibición de este dominio activo termina desencadenando la muerte celular programada de la célula tumoral (Wise *et al.*, 2013).

Todos los estudios llevados a cabo hasta el momento sugieren que la nucleolina es un blanco prometedor en la búsqueda de posibles candidatos moleculares para el desarrollo de nuevas terapias anticancerígenas (Berger *et al.*, 2015; Vasaturo *et al.*, 2018).

Las simulaciones de dinámica molecular efectuadas en este estudio demostraron fluctuaciones en los complejos analizados con una baja afinidad hacia los ligandos ácido betulínico y triptolide. Otros estudios experimentales han revelado que la especificidad y la afinidad del RBD de las nucleolinas son dependientes de las interacciones que puedan darse en estos sitios, así como también de la naturaleza química de los ligandos, ya que se ha descrito que los RBD son capaces de interactuar con varios tipos de ligandos, como los ácidos nucleicos (ARN), las proteínas, las moléculas pequeñas e, inclusive, iones como el  $\text{Ca}^{+2}$  (Serin *et al.*, 1997; Ginisty *et al.*, 2001; Losfeld *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2018).

Las fluctuaciones observadas en los valores de RMSD y RMSF de los complejos se deben principalmente a la naturaleza flexible de la nucleolina, específicamente del RBD (Allain *et al.*, 2000; Bouvet *et al.*, 2012). Esta flexibilidad favorece en gran medida las funciones de la nucleolina, tanto en su forma libre como en su estado unido a ligandos (ARN, proteína, iones, etc.), siendo dicha flexibilidad esencial para la adaptabilidad estructural (disminución del desorden estructural del RBD en unión con los ligandos), y para la reducción de los costos entrópicos que se puedan generar durante la formación de las interacciones en los complejos y que afectan directamente la afinidad hacia los ligandos (Serin *et al.*, 1997; Allain *et al.*, 2000; Bouvet *et al.*, 2012).

En los últimos años el desarrollo de terapias anticancerígenas se ha enfocado más especialmente en compuestos naturales que actúan como inductores apoptóticos. Es el caso de las moléculas evaluadas en este estudio (ácido betulínico y triptolide), que han demostrado actividad supresora de la proliferación celular en varios tipos de cáncer (Pisha *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1997; Wick *et al.*, 1999; Thurnher *et al.*, 2003; Chintharlapalli *et al.*, 2007; Hordyjewska *et al.*, 2018; Yan & Sun, 2018; Hou *et al.*, 2019).

La berberina es uno de los compuestos naturales más prometedores en la lucha contra el cáncer. Este alcaloide isoquinoléico está presente en varias especies vegetales (Imanshahidi & Hosseinzadeh, 2008; Sun *et al.*, 2009) y ha sido ampliamente estudiado. Se ha demostrado su actividad contra las células cancerosas mediante la regulación de la expresión de genes y la inhibición de proteínas (Sun *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015; Palmieri *et al.*, 2019; Rauf *et al.*, 2021). Se han reportado varios blancos moleculares de acción para la berberina en células cancerosas, por ejemplo, la AP-1 (Shen *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2009) y los ácidos nucleicos (ADN y ARN) (Islam & Kumar, 2008; Sun *et al.*, 2009; Parchehbaf-Jadid *et al.*, 2012). También se ha descrito que inhibe la N-acetiltransferasa (Lin *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2009), la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Seaver & Smith, 2004; Sun *et al.*, 2009), la telomerasa (Biao *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2009), y la topoisomerasa I mediante la formación de complejos ternarios (ADN-topoisomerasa I-berberina) (Qin *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2009).

En recientes estudios computacionales se ha evidenciado que la berberina presenta también afinidades de interacción con sitios activos del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la proteína quinasa de serina/treonina (AKT), la P38 y la quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2). Es posible que estas uniones supriman varias vías de fosforilación en células cancerígenas (Jabbarzadeh-Kaboli *et al.*, 2019).

Entre todas las dianas descritas, una de la más importante es la interacción Fas-FasL. Este alcaloide es capaz de intervenir en dicha unión mediante la regulación de la expresión de la FasL, lo cual desencadena la apoptosis de las células cancerígenas (Hsu *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2015).

En otros estudios se ha reportado que el curcumol, un compuesto con propiedades anticancerígenas, en células de carcinoma nasofaríngeo induce a la apoptosis bloqueando la proliferación celular por inhibición de las nucleolinas. También se ha encontrado que es capaz de disminuir el crecimiento de células cancerosas mamarias mediante interacción con nucleolinas y los receptores ER $\alpha$ 36 (Wang *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2023). El análisis computacional reveló que el curcumol presenta interacciones semejantes a las descritas con la berberina en el presente estudio. Este terpenoide (curcumol) se une al RBD formando el complejo nucleolina-curcumol, el cual actúa inhibiendo las actividades de la nucleolina (Wang *et al.*, 2018).

Ambos complejos (nucleolíina-curcúmol y nucleolíina-berberina) presentan residuos comunes involucrados en la estabilización de los complejos. Estos son los aminoácidos Ly49, Lys130, Lys99 y Glu80, con los cuales se generan interacciones como los puentes de hidrógeno, las uniones hidrofóbicas y las fuerzas de van der Waals (Wang *et al.*, 2018).

Tales interacciones no solo conducen a la inhibición de las actividades de la proteína, sino que posiblemente son la causa de las propiedades apoptóticas del curcúmol en las células de carcinoma nasofaríngeo (Wang *et al.*, 2018), y podrían aportar significativamente también a las afinidades de interacción y estabilidad energética de la berberina con la nucleolíina.

Todos los resultados generados en este estudio evidencian que la berberina, el ácido betulínico y el triptolide presentan afinidades de interacción con el dominio activo RBD de las nucleolíinas; sin embargo, las simulaciones de dinámica molecular revelaron que sólo la berberina exhibió interacciones estables y favorables con la nucleolíina susceptibles de estudiarse en ensayos *in vitro* e *in vivo* para así determinar todos sus blancos y mecanismos de acción en células cancerígenas.

## Agradecimientos

Al Programa Nacional de Incentivo a los Investigadores (PRONII) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) del Paraguay y al Grupo de Investigación en Biología Computacional y Bioinformática Estructural (GIBCBE) por su apoyo a esta investigación.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

## Contribución de los autores

EGM, LRA; concepción de la investigación, recolección de resultados y análisis, escritura, edición y revisión de manuscrito; EGM: diseño metodológico y experimental computacional, ensayos computacionales y simulaciones.

## Referencias

- Allain F. H. T., Gilbert D. E., Bouvet P., Feigon J. (2000). Solution structure of the two N-terminal RNA-binding domains of nucleolin and NMR study of the interaction with its RNA target. *Journal of Molecular Biology*, 303(2), 227-241. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4118>
- Arumugam S., Clarke Miller M., Maliekal J., Bates P. J., Trent J. O., Lane A. N. (2010). Solution structure of the RBD 1, 2 domains from human nucleolin. *Journal of Biomolecular NMR*, 47(1), 79-83. <https://doi.org/10.1007/s10858-010-9412-1>
- Åqvist, J., Medina, C., Samuelsson, J.E. (1994). A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Engineering, Design and Selection*, 7(3), 385-391. <https://doi.org/10.1093/protein/7.3.385>
- Berendsen, H. J., Postma, J. V., Van Gunsteren, W. F., DiNola, A. R. H. J., Haak, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, 81(8), 3684-3690. <https://doi.org/10.1063/1.448118>
- Berger C. M., Gaume X., Bouvet P. (2015). The roles of nucleolin subcellular localization in cancer. *Biochimie*, 113, 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.023>
- Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235-242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Berrada M., Serreqi A., Dabbarh F., Owusu A., Gupta A., Lehnert S. (2005). A novel non-toxic camptothecin formulation for cancer chemotherapy. *Biomaterials*, 26(14), 2115-2120. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.06.013>
- Biao L., Qihou W., Jin L., Shiqing H., Bing H. (2007). Study of the effect of berberine on the telomerase activity of human nasopharyngeal carcinoma (NPC) CNE-2. *Shanxi Medical Journal*, 36, 1281-1283.
- Bissantz, C., Kuhn, B., Stahl, M. (2010). A medicinal chemist's guide to molecular interactions. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(14), 5061-5084. <https://doi.org/10.1021/jm100112j>

- Bouvet P., Allain F. H. T., Finger L. D., Dieckmann T., Feigon, J.** (2001). Recognition of pre-formed and flexible elements of an RNA stem-loop by nucleolin. *Journal of Molecular Biology*, 309 (3), 763-775. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4691>
- Böhm, H. J., Klebe, G.** (1996). What can we learn from molecular recognition in protein–ligand complexes for the design of new drugs? *Angewandte Chemie* 35(22), 2588-2614. <https://doi.org/10.1002/anie.199625881>
- Brooks B. R., Brooks C. L., Mackerell A. D., Nilsson L., Petrella R. J., Roux B., Won Y., Archontis G., Bartels C., Boresch S., Caffisch A., Cavas L., Cui Q., Dinner A. R., Feig M., Fischer S., Gao J., Hodoscek M., Im W., Lazaridis T., Ma J., Ovchinnikov V., Paci E., Pastor R. W., Post C. B., Pu J. Z., Schaefer M., Tidor, B., Venable R. W., Woodcock H. L., Wu X., Yang W., York D. M., Karplus M.** (2009). CHARMM: The biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*, 30(10), 1545-1614. <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>
- Bugler B., Caizergues-Ferrer M., Bouche G., Bourbon H., Amalric F.** (1982). Detection and localization of a class of proteins immunologically related to a 100-KDa nucleolar protein. *European Journal of Biochemistry*, 128(2-3), 475-480. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb06989.x>
- Chen Z., Xu X.** (2016). Roles of nucleolin: Focus on cancer and anti-cancer therapy. *Saudi Medical Journal*, 37(12), 1312-1318. <https://doi.org/10.15537/smj.2016.12.15972>
- Chintharlapalli S., Papineni S., Ramaiah S. K., Safe S.** (2007). Betulinic acid inhibits prostate cancer growth through inhibition of specificity protein transcription factors. *Cancer Research*, 67(6), 2816-2823. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3735>
- Choudhury A., Das N. C., Patra R., Bhattacharya M., Ghosh P., Patra B. C., Mukherjee S.** (2021). Exploring the binding efficacy of ivermectin against the key proteins of SARS-CoV-2 pathogenesis: an *in silico* approach. *Future Virology*, 16 (4), 277-291. <https://doi.org/10.2217/fvl-2020-0342>
- Daina A., Zoete V.** (2016). A BOI-LED-Egg to Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *Chemi Med Chem*, 11(11), 1117-1121. <https://doi.org/10.1002/cmdc.20160018>
- Daina A., Michielin O., Zoete V.** (2014). iLOGP: A Simple, Robust, and Efficient Description of n-Octanol/Water Partition Coefficient for Drug Design Using the GB/SA Approach. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54(12), 3284-3301. <https://doi.org/10.1021/ci500467k>
- Daina A., Michielin O., Zoete V.** (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(1), 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Dallakyan S., Olson A. J.** (2015). *Small Molecule Library Screening by Docking with PyRx*. En J. E. Hempel, C. H. Williams, & C. C. Hong (Eds.), *Chemical Biology: Methods and Protocols* (pp. 243-250). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_19)
- Dassault Systèmes BIOVIA.** (2019). *Discovery Studio Visualizer, version 20.1*, San Diego: Dassault Systèmes.
- De Amorim H. L. N., Cáceres R. A., Netz P. A.** (2008). Linear interaction energy (LIE) method in lead discovery and optimization. *Current Drug Targets*, 9(12), 1100-1105. <https://doi.org/10.2174/138945008786949360>
- Dunn O. J.** (1964). Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics*, 6(3), 241-252. <https://doi.org/10.1080/00401706.1964.10490181>
- Ginisty H., Sicard H., Roger B., Bouvet P.** (1999). Structure and functions of nucleolin. *Journal of Cell Science*, 112(6), 761-772. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.6.761>
- Ginisty H., Amalric F., Bouvet P.** (2001). Two different combinations of RNA-binding domains determine the RNA binding specificity of nucleolin. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (17), 14338-14343. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011120200>
- Hammer O., Harper D. A. T., Ryan P. D.** (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 9.
- Hansson T., Marelius J., Åqvist J.** (1998). Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 12(1), 27-35. <https://doi.org/10.1023/A:1007930623000>
- 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), 17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>

- Hopkins A. L., Keserü, G. M., Leeson P. D., Rees D. C., Reynolds C. H.** (2014). The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(2), 105-121. <https://doi.org/10.1038/nrd4163>
- Hou W., Liu B., Xu H.** (2019). Triptolide: Medicinal chemistry, chemical biology and clinical progress. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 176, 378-392. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.032>
- Howat S., Park B., Oh I. S., Jin Y. W., Lee E. K., Loake G. J.** (2014). Paclitaxel: biosynthesis, production and future prospects. *New Biotechnology*, 31(3), 242-245. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.02.010>
- Hsu W. H., Hsieh Y. S., Kuo H. C., Teng C. Y., Huang H. I., Wang C. J., Yang S. F., Liou Y. S., Kuo W. H.** (2007). Berberine induces apoptosis in SW620 human colonic carcinoma cells through generation of reactive oxygen species and activation of JNK/p38 MAPK and FasL. *Archives of Toxicology*, 81(10), 719-728. <https://doi.org/10.1007/s00204-006-0169-y>
- Humphrey W., Dalke A., Schulten K.** (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33-38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Imanshahidi M. & Hosseinzadeh H.** (2008). Pharmacological and therapeutic effects of Berberis vulgaris and its active constituent, berberine. *Phytotherapy Research*, 22(8), 999-1012. <https://doi.org/10.1002/ptr.2399>
- Islam, M. M., Kumar G. S.** (2008). RNA targeting by small molecule alkaloids: studies on the binding of berberine and palmatine to polyribonucleotides and comparison to ethidium. *Journal of Molecular Structure*, 875(1-3), 382-391. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2007.05.004>
- Jabbarzadeh Kaboli P., Leong M. P. Y., Ismail P., Ling K. H.** (2019). Antitumor effects of berberine against EGFR, ERK1/2, P38 and AKT in MDA-MB231 and MCF-7 breast cancer cells using molecular modelling and in vitro study. *Pharmacological Reports*, 71(1), 13-23. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.07.005>
- Jo S., Kim T., Iyer V. G., Im W.** (2008). CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*, 29(11), 1859-1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>
- Johnson L., Swie Goping I., Rieger A., Mane J., Huzil T., Banerjee A., Luduena R., Hassani B., Winter P., Tuszynski A. J.** (2017). Novel colchicine derivatives and their anti-cancer activity. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(22), 2538-2558. <https://doi.org/10.2174/1568026617666170104143618>
- Jorgensen W. L., Chandrasekhar J., Madura J. D., Impey R. W., Klein M. L.** (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 79(2), 926-935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>
- Khazir J., Mir B. A., Pilcher L., Riley D. L.** (2014). Role of plants in anticancer drug discovery. *Phytochemistry Letters*, 7, 173-181. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2013.11.010>
- Kim J. S., Oh D., Yim M. J., Park J. J., Kang K. R., Cho I. A., Moon S. M., Oh J. S., You J. S., Kim C. S., Kim D. K., Lee S. Y., Lee G. J., Im H. J., Kim S. G.** (2015). Berberine induces FasL-related apoptosis through p38 activation in KB human oral cancer cells. *Oncology Reports*, 33(4), 1775-1782. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3768>
- Kim S., Lee J., Jo S., Brooks III C. L., Lee H. S., Im W.** (2017). CHARMM-GUI ligand reader and modeler for CHARMM force field generation of small molecules. *Journal of Computational Chemistry*, 38, 1879-1886. <https://doi.org/10.1002/jcc.24829>
- Kim S., Thiessen P. A., Bolton E. E., Chen J., Fu G., Gindulyte A., Han L., He J., He S., Shoemaker, B. A., Wang J., Yu B., Zhang J., Bryant S. H.** (2016). PubChem Substance and Compound data-bases. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1202-D1213. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv951>
- Kruskal W. H. & Wallis W. A.** (1952). Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260), 583-621. <https://doi.org/10.1080/01621459.1952.10483441>
- Lee J., Cheng X., Swails J. M., Yeom M. S., Eastman P. K., Lemkul J. A., Wei S., Buckner J., Jeong J. C., Qi Y., Jo S., Pande V. S., Case D. A., Brooks C. L., Mac-Kerell A. D., Klauda J. B., Im W.** (2016). CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(1), 405-413. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>
- Lin S. S., Chung J. G., Lin J. P., Chuang J. Y., Chang W. C., Wu J. Y., Tyan Y. S.** (2005). Berberine inhibits arylamine N-acetyltransferase activity and gene expression in mouse leukemia L 1210 cells. *Phytomedicine*, 12(5), 351-358. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.11.008>

- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J.** (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 3-26. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0)
- Liu, X., Wang, K., Duan, N., Lan, Y., Ma, P., Zheng, H., Li, J., Hua, Z. C.** (2015). Computational prediction and experimental validation of low-affinity target of triptolide and its analogues. *RSC advances*, 5(44), 34572-34579. <https://doi.org/10.1039/C4RA17009A>
- Liu, H., Hou, T.** (2016). CaFE: A tool for binding affinity prediction using end-point free energy methods. *Bioinformatics*, 32(14), 2216-2218. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw215>
- Liu, H., Shen, M., Zhao, D., Ru, D., Duan, Y., Ding, C., Li, H.** (2019). The effect of triptolide-loaded exosomes on the proliferation and apoptosis of human ovarian cancer SKOV3 cells. *BioMed Research International*, 2019, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2019/2595801>
- Losfeld M. E., El Khoury D., Mariot P., Carpentier M., Krust B., Briand J. P., Mazurier J., Hovanessian A. G., Legrand, D.** (2009). The cell surface expressed nucleolin is a glycoprotein that triggers calcium entry into mammalian cells. *Experimental Cell Research*, 315(2), 357-369. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.10.039>
- Meng G. Z., Xiao S. J., Zeng S. E., Li Y. Q.** (2011). Downregulation of cell-surface-expressed nucleolin inhibits the growth of hepatocellular carcinoma cells *in vitro*. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]*, 33 (1), 23-27.
- Onawole A. T., Kolapo T. U., Sulaiman K. O., Adegoke R. O.** (2018). Structure based virtual screening of the Ebola virus trimeric glycoprotein using consensus scoring. *Computational Biology and Chemistry*, 72, 170-180. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2017.11.006>
- Palmieri A., Scapoli L., Iapichino A., Mercolini L., Mandrone M., Poli F., Gianni A. B., Baserga C., Martinelli M.** (2019). Berberine and *Tinospora cordifolia* exert a potential anticancer effect on colon cancer cells by acting on specific pathways. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 33, 1-10. <https://doi.org/10.1177/2058738419855567>
- Pan L., Chai H. B., Kinghorn A. D.** (2012). Discovery of new anticancer agents from higher plants. *Frontiers in Bioscience (Schol Ed)*, 4(1), 142-156. <https://doi.org/10.2741/s257>
- Parchehbaf-Jadid A., Zarefatin L., Javadi L.** (2012). A theoretical study on interactions between Berberine as an anticancer drug and DNA. *Journal of the Iranian Chemical Research*, 5(3), 143-153.
- Parrinello, M., Rahman, A.** (1980). Crystal structure and pair potentials: A molecular-dynamics study. *Physical Review Letters*, 45(14), 1196-1199. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.45.1196>
- Patil, R., Das, S., Stanley, A., Yadav, L., Sudhakar, A., Varma, A. K.** (2010). Optimized hydrophobic interactions and hydrogen bonding at the target-ligand interface leads the pathways of drug-designing. *PloS one*, 5(8), e12029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012029>
- Phillips J. C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R. D., Kalé L., Schulten K.** (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1781-1802. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>
- Pisha E., Chai H., Lee I. S., Chagwedera T. E., Farnsworth N. R., Cordell G. A., Beecher C. W. W., Fong H. H. S., Kinghorn A. D., Brown D. M., Wani M. C., Wall M. E., Hieken T. J., Das Gupta T. K., Pezzuto J. M.** (1995). Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nature Medicine*, 1(10), 1046-1051. <https://doi.org/10.1038/nm1095-1046>
- Qin Y., Pang J. Y., Chen W. H., Zhao Z. Z., Liu L., Jiang Z. H.** (2007). Inhibition of DNA topoisomerase I by natural and synthetic mono-and dimeric protoberberine alkaloids. *Chemistry & Biodiversity*, 4(3), 481-487. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790040>
- Rauf A., Abu-Izneid T., Khalil A. A., Imran M., Shah Z. A., Emran T. B., Mitra S., Khan Z., Alhumaydhi F. A., Aljohani A. S. M., Khan I., Rahman M., Jeandet P., Gondal T. A.** (2021). Berberine as a potential anticancer agent: A comprehensive review. *Molecules*, 26 (23), 7368. <https://doi.org/10.3390/molecules26237368>
- Santana C. A., Silveira S. D. A., Moraes J. P., Izidoro S. C., de Melo-Minardi R. C., Ribeiro A. J., Tyzack J. D. N., Thornton J. M.** (2020). GRaSP: a graph-based residue neighborhood strategy to predict binding sites. *Bioinformatics*, 36(26), i726-i734. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa805>
- Schmidt M. L., Kuzmanoff K. L., Ling-Indeck L., Pezzuto J. M.** (1997). Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines. *European Journal of Cancer*, 33(12), 2007-2010. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(97\)00294-3](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(97)00294-3)
- Seaver B., Smith J. R.** (2004). Inhibition of COX isoforms by nutraceuticals. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 4(2), 11-18. [https://doi.org/10.1080/J157v04n02\\_02](https://doi.org/10.1080/J157v04n02_02)

- Serin G., Joseph G., Ghisolfi L., Bauzan M., Erard M., Amalric F., Bouvet P.** (1997). Two RNA-binding domains determine the RNA-binding specificity of nucleolin. *Journal of Biological Chemistry*, 272(20), 13109-13116. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.20.13109>
- Shen G., Jeong W. S., Hu R., Kong A. N. T.** (2005). Regulation of Nrf2, NF- $\kappa$ B, and AP-1 signaling pathways by chemopreventive agents. *Antioxidants & redox signaling*, 7(11-12), 1648-1663. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1648>
- Sun Y., Xun K., Wang Y., Chen X.** (2009). A systematic review of the anticancer properties of berberine, a natural product from Chinese herbs. *Anti-Cancer Drugs*, 20(9), 757-769. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e328330d95b>
- Tajrishi M. M., Tuteja R., Tuteja N.** (2011). Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Communicative & Integrative Biology*, 4(3), 267-275. <https://doi.org/10.4161/cib.4.3.14884>
- Thurnher D., Turhani D., Pelzmann M., Wannemacher B., Knerer B., Formanek M., Wacheck V., Selzer E.** (2003). Betulinic acid: a new cytotoxic compound against malignant head and neck cancer cells. *Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*, 25 (9), 732-740. <https://doi.org/10.1002/hed.10231>
- 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>
- Vanommeslaeghe K., Hatcher E., Acharya C., Kundu S., Zhong S., Shim J., Darian E., Guvench O., Lopes P., Vorobyov I., Mackerell A. D.** (2010). CHARMM general force field: A force field for druglike molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of Computational Chemistry*, 31(4), 671-690. <https://doi.org/10.1002/jcc.21367>
- Vasaturo M., Cotugno R., Fiengo L., Vinegoni C., Dal Piaz F., De Tommasi N.** (2018). The anti-tumor diterpene oridonin is a direct inhibitor of Nucleolin in cancer cells. *Scientific reports*, 8(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35088-x>
- Volkamer A., Kuhn D., Grombacher T., Rippmann F., Rarey M.** (2012). Combining Global and Local Measures for Structure Based Druggability Predictions. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(2), 360-372. <https://doi.org/10.1021/ci200454v>
- Walters, W. P.** (2012). Going further than Lipinski's rule in drug design. *Expert opinion on drug discovery*, 7(2), 99-107. <https://doi.org/10.1517/17460441.2012.648612>
- Wang J., Wu J., Li X., Liu H., Qin J., Bai Z., Chi B., Chen X.** (2018). Identification and validation nucleolin as a target of curcumol in nasopharyngeal carcinoma cells. *Journal of Proteomics*, 182, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.04.025>
- Wang N., Tan H. Y., Li L., Yuen M. F., Feng Y.** (2015). Berberine and Coptidis Rhizoma as potential anticancer agents: Recent updates and future perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*, 176, 35-48. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.028>
- Watanabe T., Hirano K., Takahashi A., Yamaguchi K., Beppu M., Fujiki H., Suganuma M.** (2010). Nucleolin on the cell surface as a new molecular target for gastric cancer treatment. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(5), 796-803. <https://doi.org/10.1248/bpb.33.796>
- Wei, W., Rasul, A., Sadiqa, A., Sarfraz, I., Hussain, G., Nageen, B., Liu, X., Watanabe, N., Selamoglu, Z., Ali, M., Li, X., Li, J.** (2019). Curcumol: from plant roots to cancer roots. *International Journal of Biological Sciences*, 15(8), 1600-1609. <https://doi.org/10.7150/ijbs.34716>
- Wei, Z. L., Juan, W., Tong, D., Juan, L. X., Sa, L. Y., Jie, H. F. M., Xiao, G., Xiang, L. G., Jie, H. M., Xu, C.** (2023). Curcumol inhibits breast cancer growth via NCL/ER $\alpha$ 36 and the PI3K/AKT pathway. *Food & Function*, 14 (2), 74-885. <https://doi.org/10.1039/d2fo02387c>
- Wick W., Grimmel C., Wagenknecht B., Dichgans J., Weller M.** (1999). Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289(3), 1306-1312.
- Wise J. F., Berkova Z., Mathur R., Zhu H., Braun F. K., Tao R. H., Sabichi A. L., Ao X., Maeng H., Samaniego F.** (2013). Nucleolin inhibits Fas ligand binding and suppresses Fas-mediated apoptosis in vivo via a surface nucleolin-Fas complex. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 121(23), 4729-4739. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-471094>
- Yan P., Sun X.** (2018). Triptolide: A new star for treating human malignancies. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 14(9), 271-275. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.235340>
- Zhou, P., Huang, J., Tian, F.** (2012). Specific noncovalent interactions at protein-ligand interface: implications for rational drug design. *Current Medicinal Chemistry*, 19(2), 226-238. <https://doi.org/10.2174/092986712803414150>