

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMIA
COMISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS AGRICOLAS
MARACAY



AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PROTEASAS Y UNA FRACCIÓN
ENRIQUECIDA EN TERPENOS DE LÁTEX DE
Calotropis procera Y *Pedilanthus tithymaloides*
Y EVALUACIÓN *in vitro* DE SU EFECTO CITOTÓXICO

EMMA E. RUEDA DE ARVELO

-Junio 2012-

Tesis Doctoral presentada como requisito final
Para optar al Título de Doctor en Ciencias Agrícolas

Comité Consejero

Dra. Catalina Ramis

Tutora

Dr. Bernardo Méndez

Asesor

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Francisco J. Triana-Alonso† sin cuya guía, asesoramiento, tutoría, recomendaciones y ejemplo no hubiese sido posible la realización de este trabajo.

A la Dra. Catalina Ramis, de la Facultad de Agronomía-UCV por su excelente tutoría y por su valiosa ayuda para la culminación exitosa del presente trabajo.

Al Dr. Bernardo Méndez, de la Facultad de Ciencias-UCV, por haber formado parte de mi Comité Asesor.

A los miembros del Jurado Examinador por sus correcciones y sugerencias.

A la Prof^a Ana Celia Ferreiras del BIOMED-UC, por su apoyo en el Laboratorio de Bioquímica de Acidos Nucleicos.

Al Prof. Germán Fraile, del BIOMED-UC por la formación en las técnicas de cultivos celulares *in vitro*, la aplicación de los procedimientos de cuantificación, el diseño de los experimentos y sus recomendaciones en el análisis de los experimentos.

A la Licenciada Linmar Rodriguez, del BIOMED-UC por su valioso aporte en el mantenimiento de los cultivos celulares.

A la Prof^a Milagro León, de la Cátedra de Bioquímica de la FCV-UCV, por el apoyo brindado.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (BIOMED-UC), lugar donde realicé los experimentos y procedimientos, y en especial a mis amigas y amigos del Laboratorio de Bioquímica de Acidos Nucleicos: Mónica, Roselbis, Gregoria, Mariela, Dayana, David, Ninoska, Antonio, Eduardo.

A la TSU María Virginia Castañeda, de la Cátedra de Bioquímica de la FCV-UCV, por su gran ayuda en la aplicación de las técnicas de identificación de la fracción terpenoide.

Al CDCH-UCV por el financiamiento parcial de la investigación.

A la Cátedra de Bioquímica de la FCV-UCV y, en general, a todas las personas e Instituciones que de alguna manera contribuyeron en la realización del presente trabajo.

INDICE GENERAL

	Pág
AGRADECIMIENTO.....	iii
INDICE GENERAL.....	iv
INDICE DE CUADROS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	viii
ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
I.-INTRODUCCION.....	1
II.-OBJETIVOS.....	4
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos.....	4
III.- REVISION DE LITERATURA.....	5
Presencia y composición de látex en las plantas.....	5
Características de <i>Calotropis procera</i> (Aiton) W.T. Aiton.....	8
Características de <i>Pedilanthus tithymaloides</i> (L.) Poit.....	14
Aplicaciones biotecnológicas del látex de plantas.....	17
Propiedades antitumorales o citotóxicas del látex de plantas.....	20
Propiedades antitumorales o citotóxicas de terpenos de plantas.....	23
IV.-MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
Material vegetal.....	27
Preparación del extracto crudo de látex.....	27

Contenido de proteína.....	28
Cromatografía líquida de intercambio iónico.....	28
Determinación de la actividad ribonucleasa.....	30
Determinación de la actividad proteasa.....	33
Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad proteasa.....	34
Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	35
Determinación de la masa molecular.....	38
Prueba de Glicosilación.....	38
Preparación del extracto metanólico de látex.....	39
Identificación de la fracción terpénica.....	39
Líneas celulares y cultivos.....	40
Estudios de Citotoxicidad.....	41
a.- Viabilidad y proliferación celular.....	41
b.- Necrosis y apoptosis celular.....	42
Exclusión del azul tripano.....	42
Fluorescencia con naranja de acridina/bromuro de etidio.....	43
Diseño experimental y análisis estadístico.....	45
V.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
Extracción de proteína.....	46
Determinación de la actividad proteasa.....	48
Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad proteasa.....	55
Cromatografía líquida de intercambio iónico.....	61
Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	67

Determinación de la masa molecular.....	72
Prueba de glicosilación.....	76
Identificación de la fracción terpénica.....	80
Citotoxicidad de los extractos crudos de látex y proteasas.....	80
a.- Viabilidad y proliferación celular.....	80
b.- Necrosis y apoptosis celular.....	88
Citotoxicidad de las fracciones terpenoides.....	93
VI.- CONCLUSIONES.....	97
VII.-RECOMENDACIONES.....	99
VIII.-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	100
IX.-ANEXOS.....	120

INDICE DE CUADROS

	Pág
1 Características de enzimas con actividad proteasa del látex de diversas especies de plantas.....	9
2 Actividad citotóxica <i>in vitro</i> de látex integral o fracciones de látex de diversas especies de plantas sobre líneas celulares cancerígenas humanas..	22
3 Soluciones amortiguadoras utilizadas en la preparación de los extractos crudos de látex.....	29
4 Composición de los geles de poliacrilamida-urea para electroforesis de ARN utilizados en la determinación de la actividad ribonucleasa.....	32
5 Composición de los geles de poliacrilamida para electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).....	36
6 Características de los ECL de <i>Calotropis procera</i> y <i>Pedilanthus tithymaloides</i> y condiciones óptimas de separación cromatográfica.....	68
7 Características bioquímicas de las proteínas de <i>Calotropis procera</i> y <i>Pedilanthus tithymaloides</i>	79

INDICE DE FIGURAS

	Pág
1 <i>Calotropis procera</i>	10
2 <i>Pedilanthus tithymaloides</i>	15
3 Clasificación de los terpenos de acuerdo al número de unidades isopreno en su estructura	24
4 Extracción de proteínas de látex.....	47
5 Cinética de la actividad proteasa del extracto crudo de látex (ECL) de <i>Calotropis procera</i> sobre ovoalbúmina a 60° C.....	49
6 Actividad proteasa del extracto crudo de látex (ECL) de <i>Calotropis procera</i> sobre ovoalbúmina.....	50
7 Actividad proteasa del extracto crudo de látex (ECL) de <i>Calotropis procera</i> sobre diversos sustratos.....	52
8 Cinética de la actividad proteasa del extracto crudo de látex (ECL) de <i>Pedilanthus tithymaloides</i> sobre caseína.....	53
9 Actividad proteasa del extracto crudo de látex (ECL) de <i>Pedilanthus tithymaloides</i> sobre caseína y azocaseína.....	54
10 Efecto del pH sobre la actividad proteasa del látex de <i>Calotropis procera</i> ...	56
11 Efecto de la temperatura sobre la actividad proteasa del látex de <i>Calotropis procera</i>	57
12 Efecto del pH sobre la actividad proteasa del extracto crudo de látex de <i>Pedilanthus tithymaloides</i>	59
13 Efecto de la temperatura sobre la actividad proteasa del extracto crudo de	

	látex de <i>Pedilanthus tithymaloides</i>	60
14	Separación cromatográfica del extracto crudo de látex de <i>Calotropis procera</i>	62
15	Separación cromatográfica del extracto crudo de látex de <i>Pedilanthus tithymaloides</i>	66
16	Análisis electroforético del extracto crudo de látex (ECL) y fracciones cromatográficas de <i>Calotropis procera</i>	69
17	Análisis electroforético del extracto crudo de látex (ECL) y fracciones cromatográficas de <i>Pedilanthus tithymaloides</i>	71
18	Análisis electroforético del extracto crudo de látex (ECL) de <i>Calotropis procera</i>	73
19	Análisis electroforético del extracto crudo de látex (ECL) de <i>Pedilanthus tithymaloides</i>	75
20	Prueba de glicosilación de proteínas.....	77
21	Comparación cualitativa colorimétrica de las fracciones terpenoides en los extractos metanólicos laticíferos de <i>Calotropis procera</i> y <i>Pedilanthus tithymaloides</i>	81
22	Identificación de las fracciones terpenoides en extractos metanólicos laticíferos de <i>Calotropis procera</i> y <i>Pedilanthus tithymaloides</i>	82
23	Efecto del extracto crudo de látex (ECL) de <i>Calotropis procera</i> sobre la viabilidad y la proliferación de células Jurkat.....	83
24	Efecto del extracto crudo de látex (ECL) de <i>Pedilanthus tithymaloides</i> sobre la viabilidad y la proliferación de células Jurkat.....	86

25	Citotoxicidad del extracto crudo de látex (ECL) de <i>Calotropis procera</i> y <i>Pedilanthus tithymaloides</i> sobre células Jurkat.....	89
26	Microfotografías de células Jurkat tratadas con extracto crudo de látex (ECL).....	91
27	Efecto citotóxico del extracto crudo de látex (ECL) en células Jurkat.....	92
28	Efecto del extracto metanólico de látex (EML) de <i>Calotropis procera</i> sobre la viabilidad y la proliferación de células Jurkat.....	95
29	Efecto del extracto metanólico de látex (EML) de <i>Pedilanthus tithymaloides</i> sobre la viabilidad y la proliferación de células Jurkat.....	96

ABREVIATURAS

ARNt ^{phe}	Ácido ribonucleico de transferencia específico de fenilalanina
ASB	Albúmina sérica bovina
BANA	N _α -Benzoil-DL-arginina-2-naptilamida-HCl.
CM-52	Carboximetil celulosa-52. Resina de Intercambio catiónico
Con A	Concanavalina A, lectina contenida en semillas de <i>Canavalia ensiformis</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNasa	Desoxiribonucleasa.
EDTA	Acido etilenodiaminotetraacético
HEPES	N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfonato]
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50 % del crecimiento celular
LC ₅₀	Concentración letal que provoca la muerte del 50 % de los individuos
LC ₉₀	Concentración letal que provoca la muerte del 90 % de los individuos
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromuro
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PI	Punto isoeléctrico
PSA	Persulfato de amonio
RSB	Ribonucleasa seminal bovina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
TBE	Amortiguador a base de Tris, Ácido bórico y EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
ATC	Ácido tricloroacético
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la acción citotóxica de enzimas con actividad proteasa y de fracciones terpenoides contenidas en el látex de las plantas tropicales *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton y *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit., se colectaron muestras de ambos látices a partir de plantas adultas ubicadas en la zona norte del Estado Aragua. Las proteínas solubles fueron extraídas con 16 μ L de acetato de sodio 50 mM pH 5/ μ g de látex integral y eliminada la porción poliisoprenoide por centrifugación a 16.000 x G durante 15 min, denominándose al sobrenadante “extracto crudo de látex” (ECL). El ECL fue fraccionado exitosamente por cromatografía de intercambio iónico sobre carboximetilcelulosa con elución de las proteínas con gradiente de NaCl hasta 1 M. Las fracciones colectadas fueron probadas para actividad proteasa y Ribonucleasa (RNasa). Se estimó la masa molecular de las proteínas a través de ecuaciones de regresión lineal de la relación entre la distancia de migración y el Log de la masa molecular de las proteínas marcadoras. La fracción de terpenos se obtuvo a partir de extracciones con metanol sobre látex deshidratado y se llamó “extracto metanólico de látex” (EML). Los ECL, las fracciones de proteasas y EML fueron probados en su actividad citotóxica *in vitro* sobre cultivos de células Jurkat mantenidas en medio básico RPMI-1640 con rojo de fenol, 0,2 % de bicarbonato de sodio, suplementado con 4 mM de L-glutamina, 10 % de SFB, penicilina (100 u/mL) y estreptomycin (100 μ g/mL) a 37° C en 5 % de CO₂. Se realizaron estudios de viabilidad, proliferación, necrosis y apoptosis celular, utilizando las técnicas de reducción del MTT, exclusión del azul tripano y fluorescencia con naranja de acridina/bromuro de etidio. Los resultados indican que el látex de las especies estudiadas contienen enzimas con actividad proteasa y RNasa, con masas moleculares entre 28 y 30 kDa para ambas especies. El látex de *C. procera* presentó actividad proteasa sobre caseína, azocaseína, albúmina sérica bovina (ASB) y ovoalbúmina. La actividad sobre ovoalbúmina fue mayor a pH 5 y 70° C. El látex de *P. tithymaloides* no presentó actividad sobre ASB ni ovoalbúmina pero sí hidrolizó la caseína y la azocaseína. La actividad proteásica del ECL de *P. tithymaloides* sobre azocaseína fue óptima a pH 8,5 y 70° C. La proteína con actividad RNasa presente en el látex de *P. tithymaloides* es glicosilada. Los efectos citotóxicos del ECL y del EML de *C. procera* resultaron ser independientes de las dosis evaluadas, con efectos inhibitorios sobre la viabilidad y la proliferación celular en las 24 y 48 horas de incubación con dosis de 1 μ g/mL, con porcentajes de inhibición del crecimiento celular entre 26 y 36 % con respecto al control a las 24 horas y entre 24 y 44 % a las 48 horas (ECL), y de 15 % a las 48 horas (EML). Las fracciones purificadas de proteasas no provocaron efectos citotóxicos sobre las células estudiadas. El ECL de *P. tithymaloides* presentó un efecto citotóxico dosis-dependiente sobre las células Jurkat a partir de 50 μ g/mL ($p < 0,05$). La inhibición del crecimiento celular fue de 16, 37 y 42 % al aplicar dosis de 10, 50 y 100 μ g/mL, respectivamente, después de 24 horas de incubación. A las 48 horas, el crecimiento celular fue inhibido en proporciones semejantes (17, 34 y 40 % con dosis de 10, 50 y 100 μ g/mL, respectivamente). El EML provocó efectos citotóxicos independientes de las dosis empleadas. Las fracciones purificadas de proteasas de *P. tithymaloides* no provocaron efectos citotóxicos sobre las células estudiadas.

Palabras clave: Proteasas, terpenos, látex, cultivos celulares *in vitro*, células Jurkat, actividad citotóxica, *Calotropis procera*, *Pedilanthus tithymaloides*.

ABSTRACT

In order to assess the cytotoxic action of protease enzymes and terpenoid fractions contained in the latex from *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton and *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit tropical plants, samples were collected from both adult plants located in the north of Aragua State. Soluble proteins were extracted with 16 μ L of 50 mM sodium acetate pH 5/ μ g integral latex and eliminated the poly-isoprenoid portion by centrifugation at 16,000 x g for 15 min, the supernatant was named "latex crude extract" (LCE). The LCE was successfully fractionated by ion exchange chromatography on carboxymethylcellulose, protein elution by gradient to 1 M NaCl. The fractions collected were tested for protease activity and ribonuclease (RNase). We estimated the molecular mass of proteins through linear regression equations of the relationship between migration distance and the Log of molecular mass marker proteins. The terpene fraction was obtained by extraction with methanol, dried and called "latex methanolic extract" (LME). The LCE and purified fractions were tested *in vitro* by cytotoxic activity in Jurkat cell cultures in RPMI media with phenol red, 0,2 % sodium bicarbonate, supplemented with 4 mM L-glutamine, 10 % foetal calf serum, penicillin (100 u/mL) and streptomycin (100 μ g/mL) at 37° C in 5 % CO₂. Cellular viability, proliferation, necrosis and apoptosis were evaluated using MTT assay, trypan blue exclusion and fluorescence staining with acridine orange/ethidium bromide. Results indicate that studied species latex contain enzymes with protease and Rnase activity, with molecular masses between 28 and 30 kDa for both species. The latex of *C. procera* showed protease activity on casein, azocasein, bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin. The activity on ovalbumin was higher at pH 5 and 70° C. The latex of *P. tithymaloides* no had activity on BSA or ovalbumin but hydrolyzed casein and azocasein. The protease activity of *P. tithymaloides* LCE on azocasein was optimal at pH 8,5 and 70° C. The RNase protein present in the latex of *P. tithymaloides* is glycosylated. The cytotoxic effects of *C. procera* LCE and LME were found to be dose-independent, with inhibitory effects on cell viability and proliferation at 24 and 48 hours of incubation at 1 μ g/mL, the cellular growth inhibition was between 26 and 36 % at 24 h and 24 - 44 % at 48 h (LCE), and 15 % at 48 h (LME). Protease purified fractions caused no cytotoxic effects on the studied cells. The *P. tithymaloides* LCE presented a dose-dependent cytotoxic effect on Jurkat cell from 50 μ g/mL ($p < 0,05$). The cellular growth inhibition was 16, 37 and 42 % with 10, 50 and 100 μ g/mL respectively, after 24 h of incubation. At 48 h the cellular growth was inhibited in similar proportions (17, 34 and 40 % with doses of 10, 50 and 100 μ g/mL, respectively). The LME caused dose-independent cytotoxic effects. Protease purified fractions caused no cytotoxic effects on the cells.

Keywords: Proteases, terpenes, latex, *in vitro* cell cultures, Jurkat cells, cytotoxic activity, *Calotropis procera*, *Pedilanthus tithymaloides*.

I.- INTRODUCCIÓN

Los primeros registros acerca del uso de plantas con fines medicinales datan del año 2600 AC en Mesopotamia, como es el caso del aceite de cedro para el tratamiento de infecciones parasitarias e inflamaciones, aunque la lista es muy extensa. En la actualidad, más del 50 % de las drogas utilizadas en el mundo como agentes quimioterapéuticos derivan de productos naturales; de éstos, las plantas superiores contribuyen con no menos del 25 % del total (Gurib-Fakim, 2006).

En las regiones tropicales, el potencial para encontrar nuevos compuestos es muy grande, ya que a la fecha solo el 1 % de las especies tropicales han sido estudiadas en cuanto a sus propiedades farmacológicas (Gurib-Fakim, 2006). Tres de las principales fuentes de drogas anticancerosas en el mercado y experimentadas clínicamente son derivadas de plantas de Norte América (Canadá y Estados Unidos) que fueron utilizadas por los nativos: *Asimina spp* (Kim *et al.*, 2005); *Taxus brevifolia* (Kummalue, 2005) y *Podophyllum peltatum* (Ram y Kumari, 2001); utilizadas en la actualidad para combatir efectivamente adenocarcinomas de próstata o colon y cáncer de pulmón.

Dentro del gran grupo de plantas medicinales, las especies que contienen látex han resultado ser de gran utilidad para la humanidad. Tal es el caso de *Carica papaya* (Azarkan *et al.*, 2003) y *Croton lechleri* (Fischer *et al.*, 2004), cuyos extractos son utilizados intensamente en las industrias de alimentos y farmacéutica. Una de las propiedades atribuídas, y exitosamente comprobadas clínicamente en especies de plantas con látex, es su actividad antitumoral y citotóxica, lo que le confiere un especial interés, precisamente por ser el cáncer la segunda causa de muerte por

enfermedad, después de las enfermedades cardiovasculares, a escala mundial (Organización Mundial de la Salud, 2011). Uno de los más significativos descubrimientos en el campo de las drogas anticancerosas deriva de una planta de Madagascar que contiene látex, *Catharanthus roseus* (Apocinaceae). Esta planta fue utilizada desde la antigüedad para tratar una amplia variedad de enfermedades, incluyendo la diabetes. Contiene 130 alcaloides terpenoides del tipo indol, de los cuales uno de ellos, llamado vinblastina ha sido comercializado durante mas de 40 años como una droga anticancerosa (Van Der Heijden *et al.*, 2004).

Extractos foliares obtenidos de las plantas laticíferas *Calotropis gigantea* y *Nerium oleander* presentaron actividad citotóxica, contra células de cáncer de seno MCF-7 y MDA-MB-231, comparable a los medicamentos comúnmente utilizados en los tratamientos (Wong *et al.*, 2011).

En países de Asia, el látex de las plantas de *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton, tiene múltiples aplicaciones en la medicina tradicional y es cultivada como una planta útil. En Venezuela, esta especie es considerada una maleza que invade los potreros y áreas deforestadas y, aunque es originaria de Asia y Africa, se considera naturalizada debido a su amplia distribución y excelente adaptación. La especie *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit., originaria de América tropical, es cultivada como una planta ornamental y, aunque ha sido muy poco estudiada, su contenido de abundante látex sugiere que puede ser de interés con fines medicinales. Ambas especies han sido seleccionadas para el presente estudio, no sólo por su abundante presencia de látex, sino también por ser de amplia distribución en Venezuela, de

excelente adaptabilidad a distintas condiciones agroecológicas y resistencia a diversos factores bióticos y abióticos causantes de estrés.

En muchos casos, la actividad antineoplásica de las plantas laticíferas es atribuída a los terpenos, no obstante, recientemente se reportó acción citotóxica de un extracto de proteínas laticíferas de *C.procera* (Soares *et al.*, 2007) y del látex de *Ficus carica* (Wang *et al.*, 2008), sobre diversas líneas celulares, con pocos efectos en células normales.

Por otra parte, la incidencia del cáncer en la población mundial ha incrementado en los últimos años, alcanzando cifras de 7,6 millones de defunciones debidas al cáncer en 2008, lo que representa alrededor del 30 % del total de defunciones que se calcula ocurrieron en el mundo en 2008 debidas a enfermedades no transmisibles, y se estima que estas cifras aumentarán a 13 millones de personas en el 2030 (Organización Mundial de la Salud, 2012). Estas circunstancias promueven el interés creciente en el estudio de nuevos y efectivos fármacos para combatir diferentes tipos de cáncer. En el presente trabajo se estudió el efecto de los extractos laticíferos y de proteasas purificadas de los látices de *C.procera* y *P. tithymaloides*, ambas especies poco conocidas en sus propiedades farmacognósticas, como posibles agentes anticancerosos, en cultivos *in vitro* de células Jurkat de leucemia linfocítica.

II.- OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el potencial citotóxico *in vitro* de proteasas y terpenos del látex de *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton y *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit.

Objetivos específicos

- 1.- Aislar y purificar proteasas a partir del extracto crudo de látex de *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides* en condiciones de pH y temperatura óptimas para conservar su actividad proteolítica.
- 2.- Caracterizar las enzimas proteasas por su masa molecular y presencia de glicanos.
- 3.- Separar una fracción enriquecida en terpenos a partir del látex de *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides*.
- 4.- Evaluar la actividad citotóxica *in vitro* del extracto crudo y de las fracciones aisladas de proteasas y enriquecidas en terpenos, de los látices de *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides*.

III.- REVISIÓN DE LITERATURA

Presencia y composición de látex en las plantas

El látex es el citoplasma de células altamente especializadas llamadas laticíferos. El látex, un fluido lechoso compuesto por una mezcla compleja de constituyentes en suspensión o en solución, es sintetizado en los conductos laticíferos de alrededor de 12.000 especies de plantas distribuidas en alrededor de 22 familias (Hagel *et al.*, 2008) y cerca de 900 géneros (Morcelle *et al.*, 2004), de los cuales *Euphorbia*, *Hevea*, *Manihot*, *Elaeophora* (Familia Euphorbiaceae); *Calotropis*, *Funastrum* (Familia Asclepiadaceae); *Carica* (Familia Caricaceae) y *Ficus* (Familia Moraceae) han sido de los más estudiados (Arima *et al.*, 2000; Lynn y Clevette-Radford, 1986c; Abraham y Joshi, 1979; Azarkán *et al.*, 2003).

La presencia de ciertas enzimas, como quitinasas y proteasas, en el látex, sugiere que éste puede actuar como agente de defensa de la planta contra patógenos, parásitos y herbívoros, una vez que se ha roto la célula (Vierstra, 1996). Las enzimas de la clase cisteína-proteasas participan en procesos intra y extracelulares tales como el desarrollo y maduración del fruto (Brady, 1985), como reserva nutricional, degradación de proteínas de almacenamiento en semillas en proceso de germinación (Kembhavi *et al.*, 1993; Taylor y Cuming, 1993), activación de proenzimas y degradación de proteínas defectuosas (Rudenskaya *et al.*, 1998). Se ha detectado presencia de enzimas lipasas, cuya función aún no ha sido demostrada, aunque se ha propuesto que están involucradas tanto en la síntesis, como en la hidrólisis de ésteres terpénicos durante la formación de las partículas de látex (Giordani *et al.*, 1991). A partir del látex de *Chelidonium majus*, una planta de la

familia Papaveraceae ampliamente distribuída en Europa y el oeste de Asia, se ha logrado aislar dos nucleasas de 20 y 36 kDa con actividad RNasa y DNasa, respectivamente (Nawrot *et al.*, 2008), a las cuales se les atribuye participación, en el ciclo de vida de las plantas, en el desarrollo de tejidos y órganos, en la respuesta al estrés y en la apoptosis o muerte celular programada (Dohnálek *et al.*, 2011), así como también en el desarrollo del sistema vascular y en las respuestas a patógenos virales (Matousek *et al.*, 2003).

Así mismo, se ha reportado presencia de metabolitos especializados como productos finales que no regresan al metabolismo primario, muchos de los cuales son citotóxicos por lo que se ha sugerido que los laticíferos evolucionaron como un medio para secuestrar tales compuestos, independiente de los tejidos vasculares, evitando posibles daños a la planta que los sintetiza (Hagel *et al.*, 2008).

En general, el látex de cualquier especie vegetal contiene una variedad de componentes celulares, como núcleo, mitocondria, ribosomas y lisosomas, (Morcelle *et al.*, 2004). En su composición resaltan metabolitos especializados como terpenoides, glicósidos cardíacos, alcaloides, lignanos, taninos, poliisoprenoides, proteínas, aminoácidos libres, almidones y azúcares (Morcelle *et al.*, 2004; Hagel *et al.*, 2008; Domsalla y Melzig, 2008).

En el látex de plantas del género *Euphorbia* se ha encontrado en su composición una variedad de diterpenos (Ravikanth *et al.*, 2002; Ravikanth *et al.*, 2003), triterpenos (De Pascual *et al.*, 1987), ésteres de di y triterpenos (Vogg *et al.*, 1999), lectinas con un amplio rango de capacidad hemaglutinante (Lynn y Clevette-Radford, 1986a; Stirpe *et al.*, 1993) y enzimas de diversos tipos tales como serina-

proteasas (Lynn y Clevette-Radford, 1983; 1984; 1985a,b; 1986b,c; 1988; Arima *et al.*, 2000; Yadav *et al.*, 2006), fosfatasa ácida (Lynn y Clevette-Radford, 1987a), fosfatasa alcalina, leucina aminopeptidasa, esterasas, N-acetil- β -glucosaminidasa, α -manosidasa, α y β -galactosidasa, α y β -glucosidasa, α -amilasa, celulasa (Lynn y Clevette-Radford, 1987b) y lipasas (Palocci *et al.*, 2003). También se ha reportado, en el látex de *C. procera*, la presencia de actividad antioxidante de las enzimas superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa, las cuales participan en la dismutación de radicales superóxido y en la detoxificación del H₂O₂, respectivamente, intervienen en la resistencia al estrés y/o regulación de la duración del flujo de látex y confirman la función protectora contra posibles daños oxidativos, los cuales se inician después de las heridas de las hojas (Freitas *et al.*, 2007).

El látex de plantas del género *Carica* (*C. papaya*) contiene cuatro cisteína endopeptidasas: papaina, quimopapaina, glicil endopeptidasa y caricaina, sintetizadas como precursores inactivos que se convierten en enzimas maduras dentro de los 2 min siguientes al corte de la planta (Azarkan *et al.*, 2003). Similarmente, el látex de *Calotropis gigantea* también contiene cuatro clases de cisteína proteasas: calotropinas FI, FII, DI y DII (Abraham y Joshi, 1979; Pal y Sinha, 1980). En el látex de *Calotropis procera* se ha reportado una cisteína proteasa estable, llamada proceraína, con una masa molecular de 28,8 kDa, con capacidad para actuar sobre caseína, azocaseína, azoalbúmina y hemoglobina con alta actividad específica y actividad hidrolítica sobre ciertos sustratos sintéticos (Dubey y Jagannadham, 2003). Una electroforesis bidimensional, confirmada por espectrometría de masa, reveló la

presencia de proteínas con pesos moleculares que van desde 5 hasta 95 kDa, con un componente cuantitativamente importante con masa molecular de 26 kDa. Se detectó actividad antioxidante y proteolítica compartida por al menos cuatro cisteína proteasas distintas, en ausencia de serina y metalo proteinasas e indicios de una aspártico proteasa (Freitas *et al.*, 2007). En otras especies laticíferas como *Synadenium grantii* (Rajesh *et al.*, 2006) y *Funastrum clausum* se han identificado enzimas proteolíticas del tipo serina proteasa y cisteína proteasa, respectivamente (Menon *et al.*, 2002; Morcelle *et al.*, 2004). Un resumen de las principales propiedades bioquímicas de las enzimas proteolíticas presentes en látices de plantas, reportadas hasta la fecha, se presenta en el cuadro 1. La mayoría de las proteasas de látex pertenecen a la familia de las cisteína o serina endopeptidasas, y solo una, reportada hasta la fecha, a la familia de las aspártico endopeptidasas.

Una exhaustiva revisión sobre las características y propiedades bioquímicas de las proteasas laticíferas ha sido realizada por Domsalla y Melzig (2008).

Características de *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton

Calotropis procera (Familia Asclepiadaceae) es una hierba arbustiva, o arbusto, que crece en áreas alteradas y pastizales. Nativa de Asia, es considerada una especie naturalizada en Venezuela, donde recibe el nombre común de “Algodón de la India” (figura 1). En la India, es una popular planta medicinal. Del extracto etanólico de las flores se han reportado propiedades antimicrobiana, antiinflamatoria, antipirética, analgésica (Mascolo *et al.*, 1988), anticancerosa (Smith *et al.*, 1995) y antimalarial (Sharma y Sharma, 1999; 2001).

Cuadro 1. Características de enzimas con actividad proteasa del látex de diversas especies de plantas

Especie	Proteasa	Mm (kDa)	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	PI	Referencia
Serina-proteasas						
<i>Euphorbia pulcherrima</i>	Euphorbaína P	74	7	NR	4,7	Lynn y Clevette-Radford (1984)
<i>Euphorbia tirucalli</i>	Euphorbaínas T	74	NR	NR	4 a 5,5	Lynn y Clevette-Radford (1985a,b)
<i>Euphorbia milli</i>	Milina	51	8	60	7,2	Yadav <i>et al.</i> (2006)
<i>Cryptolepis buchanani</i>	Cryptolepaína	50,5	8 a 10	65 a 75	6,0	Pande <i>et al.</i> (2006)
<i>Ipomoea carnea</i>	Carneína	80,2	6,5	65	5,6	Patel <i>et al.</i> (2007)
<i>Morus indica</i>	Indicaína	67,2	8,5	80	4,8	Sing <i>et al.</i> (2008)
<i>Wrightia tinctoria</i>	Wrightina	57,9	7,5 a 10	70	6	Tomar <i>et al.</i> (2008)
Cisteína-proteasas						
<i>Ficus carica</i>	Ficaína A,B,C,D	25	8	50 a 55	8,3 a 10,2	Sugiura y Sasaki (1973)
<i>Calotropis gigantea</i>	Calotropina DI	23,8	7,5 a 8	55 a 60	9,5	Sengupta <i>et al.</i> (1984)
	Calotropina DII	24,2	7,5 a 8	55-60	9,6	Sengupta <i>et al.</i> (1984)
<i>Ficus glabrata</i>	Ficaína	NR	7	NR	9,3	Malthouse y Brocklehurst (1976)
<i>Carica papaya</i>	Caricaína	23,3	7	NR	11,7	Azarcan <i>et al.</i> (2003)
	Papaína	23,4	5,5 a 7	NR	8,8	Azarcan <i>et al.</i> (2003)
	Quimopapaína	23,6	7	NR	10,5	Azarcan <i>et al.</i> (2003)
<i>Ervatamia coronaria</i>	Ervatamina A	27,6	8 a 8,5	50-55	8,4	Nallamsetty <i>et al.</i> (2003)
	Ervatamina B	26	6 a 6,5	50-55	9,4	Kundu <i>et al.</i> (2000)
	Ervatamina C	23	7,5 a 8	50	9,5	Takhurta <i>et al.</i> (2004)
<i>Funastrum clausum</i>	Funastraína II	23,6	6 a 11	NR	9,3	Morcelle <i>et al.</i> (2004)
<i>Calotropis procera</i>	Proceraína	28,8	7 a 9	55-60	9,3	Dubey y Jagannadham (2003)
Aspartil-proteasas						
<i>Ficus racemosa</i>	NR	44,5	4,5 a 6,5	60	NR	Devaraj <i>et al.</i> (2008)
No clasificadas						
<i>Euphorbia amigdaloides</i>	NR	26	5	60	NR	Demir <i>et al.</i> (2005)
<i>Pedilanthus tithymaloides</i>	Pedilanthina	63,1	8 a 9,5	65 a 70	NR	Bhowmick <i>et al.</i> (2008)

Mm= Masa molecular. PI= Punto isoeléctrico. NR= No reportado



Figura 1. *Calotropis procera*.

Otros extractos de la planta en solventes orgánicos, como etanol y acetona, han presentado actividades insecticida (Mousry, 1997), larvicida (Markouk *et al.*, 2000), antibacteriana y antiparasitaria (Larhsini *et al.*, 1999). Extractos foliares con importantes contenidos de triterpenos, antocianinas y alcaloides provocaron efecto positivo en el control del helminto gastrointestinal *Haemonchus contortus* en pequeños rumiantes (Al-Qarawi *et al.*, 2001).

Un extracto crudo del tallo preparado en acetona, conteniendo saponinas, taninos, glicósidos cardíacos, alcaloides y flavonoides, presentó mayor actividad antimicoplasma en comparación con el fármaco convencional tilosina, utilizado comúnmente en el tratamiento de la micoplasmosis en Nigeria, por lo que se ha considerado una planta promisoría para ser utilizada como agente para combatir el *Mycoplasma spp*, que afecta animales y humanos (Muraina *et al.*, 2010).

El extracto clorofórmico del tallo de esta planta mostró significativa actividad antiinflamatoria y protectora de la mucosa gástrica cuando se suministró a ratas albinas, por vía oral, en dosis de 200 y 400 mg/kg, respectivamente (Tour y Talele, 2011). Al igual que los extractos de diferentes partes de la planta, el látex de *Calotropis procera* también presentó actividad antifúngica (De Freitas *et al.*, 2011), antiinflamatoria (Kumar y Basu, 1994), anticoccidial (Mahmoud *et al.*, 2001), anti-diarreica (Kumar *et al.*, 2001) y analgésica (Dewan *et al.*, 2000). Alencar *et al.* (2004) evaluaron el efecto antiinflamatorio de una fracción de proteína no dializada recuperada de látex libre de goma, utilizando tres modelos experimentales en ratones: peritonitis, edema podal y cistitis hemorrágica. La migración de neutrófilos *in vivo* inducida por 500 µg de carragenina fue severamente inhibida por las proteínas del

látex, alcanzando una inhibición máxima de 80 % con una dosis de 100 mg/Kg. El edema podal exacerbado por la carragenina fue casi completamente suprimido después de 4 horas y controlado dentro de la primera hora siguiente a la administración de las proteínas del látex, así mismo, previnieron el edema vesical inducido por fosfoamida en los ratones.

Una fracción proteica del látex de *C. procera* fue evaluada en un proceso inflamatorio al inducir una infección experimental letal en un modelo murino causado por *Salmonella* entérica. Ratones que recibieron 0,2 mL de proteínas laticíferas (30 o 60 mg/Kg) por ruta intraperitoneal, oral o subcutánea, 24 horas antes o después de suministrar, por igual vía, una carga letal conteniendo *Salmonella typhimurium*, evitó la muerte de los ratones durante los 28 días de observación, mientras que todos los animales del grupo control sucumbieron a la infección en los primeros 6 días después de ser inoculados (Lima-Filho *et al.*, 2010).

Antagónicamente, el látex de esta planta puede provocar inflamación de la piel y las membranas mucosas. Al inyectar un extracto acuoso de látex seco en la superficie podal de ratas se produjo una respuesta hiperalgésica que permitió evaluar el efecto antiinflamatorio de algunas drogas como el diclofenac, el rofecoxib y la ciproheptadina (Sehgal y Kumar, 2005). La inyección subcutánea de una solución acuosa (0,1 mL al 1 %) de látex seco en la superficie podal de ratas produjo una inflamación significativa, con una respuesta máxima inflamatoria expresada una hora después de la inyección, y un incremento en la permeabilidad vascular que alcanzó su máximo a los 15 min después de la aplicación (Singh *et al.*, 2000).

Por otra parte, el efecto antioxidante y antihiperглиcémico del látex seco de *C. procera* contra la diabetes inducida por aloxano en ratas, fue evaluado al suministrar dosis orales diarias de 100 y 400 mg/Kg. El látex provocó una disminución, dependiente de la dosis, en la glucosa sanguínea e incrementó el contenido de glucógeno hepático. (Roy *et al.*, 2005). El látex seco también previno la pérdida de peso corporal en ratas diabéticas e incrementó los niveles hepáticos de los antioxidantes endógenos superóxido dismutasa, catalasa y glutatión. Su eficacia como agente antioxidante y antidiabético es comparable a la del glibenclamida, utilizada normalmente como fármaco antidiabético (Roy *et al.*, 2005).

Extractos de proteínas laticíferas demostraron actividad depresiva en el sistema nervioso central, promoviendo acción anticonvulsionante y sedante en modelos de ratones a los cuales se les indujo convulsiones o somnolencia con medicamentos controlados (Lima *et al.*, 2012).

El látex de *C. procera* ha sido utilizado exitosamente para purificar la enzima cruda amilasa a partir de fermentos cultivados de *Aspergillus oryzae*. El mecanismo de acción del látex es semejante al del ácido poliacrílico, un polielectrolito sintético, e inclusive podría sustituir el uso de métodos convencionales para purificar enzimas, tales como la precipitación con sulfato de amonio (Kareem *et al.*, 2003). El látex con una dilución 10^{-2} , permitió concentrar la amilasa en 4 veces con un 97 % de recuperación con respecto a la actividad inicial en el cultivo (Kareem *et al.*, 2003).

En otro orden de ideas, experimentos de fermentación han demostrado que *C. procera* es un buen sustrato para la producción de biogas, con productividades que varían entre 2,9 y 3,6 litros de biogas/día en biodigestores cargados con una

suspensión de hojas secas al 4 % (p/v) y un pH inicial de 7,5 (Traore, 1992). La identificación y el cultivo de plantas ricas en carbohidratos como fuentes renovables de químicos para uso como combustible ha generado interés desde finales de la década de los setenta (Nielsen *et al.*, 1977). Estudios recientes han caracterizado a *C. procera* como una de las plantas tropicales con mayor contenido de carbono, hidrógeno, nitrógeno, α -celulosa, aceites, hidrocarburos, polifenoles y proteína cruda, sugiriendo que, si se cultiva como fuente de energía, podría también ser usada en la manufactura de papel y otros subproductos después de la extracción de sus hidrocarburos (Kalita y Saikia, 2004). Así mismo, plantas cultivadas en suelos contaminados con metales provenientes de la industria del vidrio en el Norte de la India, mostraron potencial para ser utilizadas en tecnologías de fitoremediación (Varun *et al.*, 2012) y resultaron efectivas para remover metales pesados, como Pb y Cd, de tierras contaminadas acopladas con estrés ambiental (D'Souza *et al.*, 2010).

Características de *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit.

Pedilanthus tithymaloides (Familia Euphorbiaceae) es una planta oriunda de la América tropical, cultivada como ornamental en muchas regiones (figura 2). En Venezuela se encuentra en estado natural en las regiones xerofíticas del norte del país. Un tamizaje fitoquímico del látex de *P. tithymaloides* detectó la presencia de triterpenos, esteroides, carotenos, azúcares reductores, aminos, fenoles, taninos y flavonoides (Sánchez *et al.*, 2005). También se han aislado terpenoides y alcoholes de cadena larga con actividad biológica (Mohamed *et al.*, 1996). El extracto etanólico de las hojas presentó actividad antimicrobiana semejante a la tetraciclina sobre



Figura 2. *Pedilanthus tithymaloides*.

Pseudomonas aeruginosa (Vidotti *et al.*, 2006), actividad antiinflamatoria sobre un modelo de edema podal en ratas y capacidad antioxidante contra especies de oxígeno y nitrógeno reactivas, especialmente para HO[·], O₂⁻, HOCl, ONOO⁻ y [·]NO.

Abreu *et al.* (2006) han señalado que esta planta tiene usos tradicionales como emético, antiinflamatorio, antibiótico, antiséptico, antihemorrágico, antiviral, abortivo y como agente antitumoral, aunque no se han realizado suficientes estudios que confirmen estas propiedades atribuidas empíricamente.

Un extracto etanólico de las hojas de esta planta, conteniendo flavonoides, fenoles y esteroides, demostró actividad biológica contra huevos, larvas y pupas de *Culex quinquefasciatus*, provocando alta mortalidad en cada estado de vida del insecto, un vector de un nemátodo altamente infeccioso, en Asia tropical (Kamalakaran *et al.*, 2010).

Aunque limitados, hay algunos reportes sobre componentes proteicos del látex de *P. tithymaloides*. Se ha encontrado una lectina específica para galactosa con actividad mitogénica en linfocitos de bazo murino (Seshagirao, 1995). Esta lectina se ha utilizado en estudios del patrón de hemaglutinación en pacientes con diabetes mellitus (Nagda y Deshmukh, 1998) y tuberculosis (Ankush *et al.*, 2003).

A partir de *Pedilanthus sp* se ha reportado el aislamiento de una proteína, llamada pedilstatina, con acción inhibidora de crecimiento de la línea celular de leucemia linfocítica P388 (Pettit *et al.*, 2002). Así mismo, se ha reportado una proteasa del látex, designada como “pedilantaina”, con actividad antiinflamatoria oral (Dutta y Dhar, 1984; Dhar *et al.*, 1988) y, más recientemente, se ha logrado la purificación y caracterización de una proteasa que ha sido denominada pedilanthina,

con una masa molecular aproximada de 63,1 kDa, capacidad para hidrolizar caseína, azocaseína y azoalbúmina, con poca actividad hacia sustratos sintéticos y alta estabilidad hacia cambios de pH, temperatura, solventes orgánicos y agentes desnaturalizantes (Bhowmick *et al.*, 2008). *P. tithymaloides* ha sido evaluada como una potencial fuente renovable de hidrocarburos. Extractos obtenidos con solventes como éter de petróleo, benceno y etil acetato, a partir de hojas y tallos completos, contenían una mezcla de hidrocarburos con características comparables a las de los combustibles fósiles y otras fuentes de energía convencionales (De *et al.*, 1997).

Aplicaciones biotecnológicas del látex de plantas

Las enzimas proteasas aisladas del látex de diversas especies de plantas representan uno de los tres más importantes grupos de enzimas de uso industrial, constituyendo aproximadamente el 60% del total de enzimas comercializadas en el mundo (Morcelle *et al.*, 2004). El uso de proteasas en el desarrollo de tecnologías ambientalistas incluye el tratamiento de pieles y procesos de bioremediación (Uhlig, 1998) y su aplicación en la incorporación a detergentes domésticos (Sangeetha y Abraham, 2006). Recientemente se ha identificado, en la región de la Patagonia, una planta de la familia Apocynaceae cuyo látex contiene proteasas alcalinas, que están siendo actualmente aisladas, purificadas y caracterizadas, a los fines de lograr la superexpresión de estas proteasas vegetales en microorganismos y obtener una producción a gran escala bajo condiciones controladas, que tendrán promisorias aplicaciones industriales (Sequeiros, 2006). La mayoría de las proteasas que han sido aisladas y caracterizadas en diversas especies de plantas laticíferas tienen estabilidad a altas temperaturas, condiciones variables de pH, presencia de agentes caotrópicos y

solventes orgánicos, lo que les confiere potencial utilidad y aplicabilidad en las industrias (Yadav *et al.*, 2006); adicionalmente, presentan la cualidad de no ser propensas a autólisis, aún a bajas concentraciones (Patel *et al.*, 2007; Bhowmick *et al.*, 2008; Dubey y Jagannadham, 2003; Tomar *et al.*, 2008). Otras enzimas presentes en látices de plantas, con alto potencial biotecnológico, son las quitinasas, enzimas capaces de hidrolizar la quitina, el segundo biopolímero natural más abundante, después de la celulosa, formado por cadenas lineales de β -1,4-homopolímero de residuos de N-acetilglucosamina (Haki y Rakshit, 2003). La quitina forma el exoesqueleto de los artrópodos y representa uno de los mayores productos de desechos en la industria camaronera, con un estimado de 2,5 millones ton/año en algunos países, por lo que el uso de enzimas quitinasas en tecnologías ambientalistas se hace cada vez más promisorio (Haki y Rakshit, 2003). Los látices de *Calotropis procera* y *Carica candamarcensis* contienen enzimas con alta actividad quitinasa, como parte de una estrategia de defensa de la planta contra hongos e insectos predadores (Freitas *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2011), que podría ser de utilidad como parte de las biotecnologías ambientalistas para clarificar aguas servidas y en la degradación de los desechos de la industria camaronera. Así mismo, las quitinasas termoestables tienen utilidad en la industria de alimentos, cosméticos, farmacéutica y agroquímica (Haki y Rakshit, 2003).

El extracto acuoso del látex de *Euphorbia tirucalli* ha probado ser eficaz como molusquicida, en el control del caracol *Lymnaea acuminata*, que actúa como vector de la *Fasciola hepática* y *Fasciola gigantica*, con valores de la concentración letal que provoca la muerte del 50 % de los individuos (LC₅₀) de 0,92 mg/L y 0,51

mg/L en 24 y 96 horas respectivamente, sin causar mortalidad, aún en presencia de una LC₉₀, en el pez *Channa punctatus* que comparte el mismo hábitat del caracol (Tiwari y Singh, 2005). Dosis sub-letales del extracto acuoso provocaron alteraciones significativas en las concentraciones de glicógeno, piruvato, lactato, proteína total y aminoácidos libres, así como en la actividad de las enzimas deshidrogenasa láctica, deshidrogenasa succínica, citocromo oxidasa, aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa de *L. acuminata* (Tiwari y Singh, 2005).

Algunos látices de plantas pueden presentar propiedades insecticidas. Fracciones de terpenos, obtenidas del látex de *Glossocarya calcicola*, presentaron efectos citotóxicos contra insectos, con valores de concentración inhibitoria del 50 % del crecimiento celular (IC₅₀) de 2,1 a 3,1 µg/mL sobre *Drosophyla melanogaster* (Rasikari *et al.*, 2005).

El látex de *Hevea brasiliensis* ha tenido una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas, principalmente derivadas de su contenido de poliisoprenoides (goma), cuya producción mundial alcanzó 10.280.888 toneladas en el 2009 (FAO, 2011) y 10.399.000 toneladas en 2010 según estadísticas más recientes del International Rubber Study Group (IRSG, 2012), y son destinadas a la fabricación de materiales como el caucho, pelotas, guantes quirúrgicos, mascarillas, sondas, drenajes, catéteres, torniquetes, jeringas, cintas adhesivas, estetoscopios, prótesis dentales, gomas de borrar, balones, tetinas, botas de goma, plantillas para zapatos, y otros, en una lista que reúne más de 40.000 productos (www.elergonomista.com/iberlátexpueden.html).

Propiedades antitumorales o citotóxicas del látex de plantas

Numerosas investigaciones se realizan en el mundo en la búsqueda de nuevas sustancias que contribuyan a combatir la alteración de la proliferación y diferenciación celular (neoplasia). El estudio de los componentes de plantas para estos fines constituye un amplio campo de investigación que se ha basado en los usos tradicionales, desde tiempos remotos, principalmente en países de Asia, y que actualmente se estudian en diferentes países del mundo. Muchos extractos de plantas, particularmente aquellos que contienen compuestos fenólicos, tienen actividad antioxidante significativa y son capaces de reducir los efectos tóxicos de los radicales libres y la aparición de patologías asociadas, como la carcinogénesis (Middleton *et al.*, 2000). El látex de *Croton lechleri*, característicamente de color rojo, presentó una actividad significativa contra los daños oxidativos inducidos por la apomorfina en *Saccharomyces cerevisiae* y fue capaz de proteger células de plántulas de maíz del efecto citotóxico de la apomorfina (Lopes *et al.*, 2004). También presentó efectos antiproliferativos *in vitro* en líneas celulares leucémicas K 562, con un IC₅₀ de 2,5 ± 0,3 µg/mL (Rossi *et al.*, 2003). Al evaluar el efecto citotóxico del extracto etanólico al 70 % (v/v) de material seco proveniente de 14 especies de plantas colectadas en la India y Nepal, sobre células tumorales COLO 320, se encontró que el extracto de las flores de *C. procera* y del fruto de *Semecarpus anacardium* produjeron el efecto más marcado, con valores de IC₅₀ de 1,4 y 1,6 µg/mL, respectivamente (Smith *et al.*, 1995). La evaluación de la propiedad anticáncer del látex seco de *C. procera* en un modelo de ratón transgénico X15-myc de carcinoma hepatocelular arrojó como

resultado una protección total contra la hepatocarcinogénesis sin efectos adversos en los animales que recibieron dosis de 400 mg/Kg de suspensiones acuosas orales de látex por 5 días/semana durante 15 semanas (Choedon *et al.*, 2006).

Diversas líneas celulares tratadas por 72 horas con diferentes concentraciones de proteínas laticíferas obtenidas a partir del látex de *C. procera* produjeron supresión significativa de su crecimiento, de una manera dependiente de la dosis, sin afectar el crecimiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) obtenidas de individuos saludables utilizadas como control (Soares *et al.*, 2007). Concentraciones de 0,25; 0,5 y 1 µg de proteína/mL provocaron una reducción significativa de la viabilidad celular e inhibición de la síntesis de ADN ($p < 0,05$) en células HL-60 (leucemia promielocítica); sin embargo, no causaron un incremento significativo en el número de células necróticas a ninguna de las concentraciones probadas (Soares *et al.*, 2007). Así mismo, el látex de la fruta de *Ficus carica* exhibió una potente actividad citotóxica, dependiente de la dosis y el tiempo, en algunas líneas de células humanas cancerígenas (glioblastoma y carcinoma hepatocelular), con poco efectos en células hepáticas normales, a través de un mecanismo que podría estar asociado a la inhibición en la síntesis de ADN, la inducción a la apoptosis y el arresto del ciclo celular de las células cancerígenas (Wang *et al.*, 2008).

En el cuadro 2 se presenta un resumen de los valores de IC₅₀ de diversas fracciones laticíferas de plantas sobre diferentes líneas celulares de cáncer.

Cuadro 2. Actividad citotóxica *in vitro* de látex integral o fracciones de látex de diversas especies de plantas sobre líneas celulares cancerígenas humanas

Especie	Fracción evaluada	Línea celular	IC ₅₀ (µg/mL)	Referencia
<i>Calotropis procera</i>	Látex integral	Colo 20 (colon)	1,4	Smith <i>et al.</i> (1995)
<i>Croton lechleri</i>	Látex integral	K 562 (leucemia)	2,5	Rossi <i>et al.</i> (2003)
<i>Glossocarya calcicola</i>	Diterpeno 1	Hep-G2 (adenocarcinoma hepático)	9,0	Rasikari <i>et al.</i> (2005)
	Diterpeno 2	Hep-G2 (adenocarcinoma hepático)	16,2	
	Diterpeno 3	Hep-G2 (adenocarcinoma hepático)	8,3	
<i>Calotropis procera</i>	Proteínas	HL-60 (leucemia)	0,86	Soares <i>et al.</i> (2007)
		HCT-8 (colon)	1,12	
		SF-295 (cerebro)	0,42	
		MDA-MD-435 (seno)	1,36	
<i>Jatropha integerrima</i>	Ciclopéptido 1	KB (carcinoma nasofaríngeo)	0,46	Welé <i>et al.</i> (2007)
	Ciclopéptido 2	KB (carcinoma nasofaríngeo)	0,66	
<i>Ficus carica</i>	Látex integral	U 251 (Glioma)	0,8	Wang <i>et al.</i> (2008)
		SMMC-7721 (carcinoma hepatocelular)	0,25	

IC₅₀= Concentración de la sustancia evaluada a la cual se produce la inhibición del 50 % del crecimiento celular.

Propiedades antitumorales o citotóxicas de los terpenos de plantas

Los terpenos son metabolitos derivados del isopentenil pirofosfato y constituyen el grupo más numeroso de fitoquímicos. Los hidrocarburos terpénicos se clasifican de acuerdo al número de unidades isoprenoides que contienen. Una unidad terpénica está formada por dos subunidades isopreno, de forma que los monoterpenos, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos contienen 2, 4, 6 y 8 unidades de isopreno, respectivamente (Gonzalez, 1991). Un esquema simplificado de clasificación se presenta en la figura 3. Se ha estimado que existen más de 20.000 triterpenoides en la naturaleza, presentes en numerosas especies de plantas, en las cuales se sintetizan por ciclización del escualeno, un hidrocarburo triterpeno precursor de todos los esteroides. Se ha reportado que al menos 6 diferentes tipos de diterpenos aislados a partir de *Taiwania cryptomerioides* poseen una potente actividad citotóxica contra células cancerígenas KB de carcinoma epidermoide (Chang *et al.*, 2005). Asimismo, fracciones de terpenos obtenidas del látex de *Glossocarya calcicola* provocaron una inhibición significativa del crecimiento de las líneas celulares de mamíferos A2780, HepG2, HS27, PC3 y MCF7 (Rasikari *et al.*, 2005) con efecto citotóxico contra líneas celulares de carcinoma humano (HepG2) con valores de IC₅₀ de 8,3 a 16,2 µg/mL sobre cultivos *in vitro* de HepG2 (Rasikari *et al.*, 2005). Resultados semejantes fueron obtenidos al evaluar el efecto de diversas concentraciones de un extracto metanólico del látex sobre la citotoxicidad de las líneas celulares de hepatoma (Huh7) y no hepatoma (COS-1). El extracto indujo la muerte celular en ambas líneas celulares en una forma dosis dependiente (Choedon *et al.*, 2006).

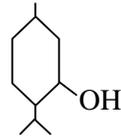
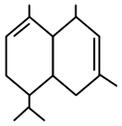
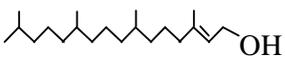
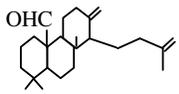
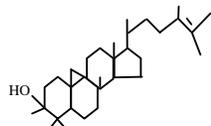
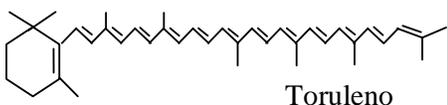
Nombre común	Unidades isopreno	Átomos de carbono	Sub-clase	Ejemplos
Hemiterpenos	1	5		$\text{H}_2\text{C}=\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{P}}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{P}}-\text{O}^-$ <p style="text-align: center;">Isopentenil pirofosfato</p>
Monoterpenos	2	10	<ul style="list-style-type: none"> -Regulares -Irregulares -Piretroides -Iridoides 	 <p style="text-align: right;">Mentol</p>
Sesquiterpenos	3	15	<ul style="list-style-type: none"> -Farnesenos -Cíclicos -Lactonas 	 <p style="text-align: right;">Cadineno</p>
Diterpenos	4	20	<ul style="list-style-type: none"> -Acíclicos -Bicíclicos -Tricíclicos -Policíclicos -Macrocíclicos 	 <p style="text-align: right;">Fitol</p>
Sesterpenos	5	25		 <p style="text-align: right;">Luteona</p>
Triterpenos	6	30	<ul style="list-style-type: none"> -Tetracíclicos -Pentacíclicos -Saponinas 	 <p style="text-align: right;">Cicloartenol</p>
Tetraterpenos	8	40	<ul style="list-style-type: none"> -Carotenos -Xantofilas 	 <p style="text-align: right;">Toruleno</p>
Politerpenos	> 9	> 45		$\left[\text{H}_2\text{C}=\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2- \right]_n$ <p style="text-align: center;">Poliisopreno</p>

Figura 3. Clasificación de los terpenos de acuerdo al número de unidades isopreno en su estructura. (Azcon-Bieto y Talon, 1993; Marcano y Hasegawa, 2002).

No obstante, algunos ésteres de diterpenos, del tipo forbol e ingenol, aislados a partir de látex y extractos foliares de *Euphorbia leuconera*, son agentes promotores de tumores muy activos (Vogg *et al.*, 1999).

Diversos triterpenos han sido utilizados para propósitos medicinales en varios países de Asia, en donde se les atribuye efectos antiinflamatorio, analgésico, antipirético, hepatoprotectivo, cardiotónico y sedante. Recientes estudios no solo han confirmado algunas de estas propiedades farmacológicas, sino también han identificado una variedad de actividades biológicas adicionales como antioxidante, antimicrobiana, antiviral, antialérgico, antiprurítico, antiangiogénico y espasmolítica. Un número cada vez mayor de triterpenos que han sido reportados, exhiben citotoxicidad contra diversas células cancerígenas sin mostrar toxicidad en células normales (Bishayee *et al.*, 2011).

A partir de rizomas secos de *Ardisia gigantifolia*, una planta usada tradicionalmente como medicinal en China, para el tratamiento del reumatismo, dolores musculares y daños traumáticos, se han aislado al menos 32 saponinas triterpénicas en los últimos 20 años (Mu *et al.*, 2010) y, recientemente, estos autores lograron aislar e identificar 4 nuevas saponinas triterpenoidales a partir del extracto etanólico del rizoma seco de la planta, los cuales fueron evaluados en sus propiedades citotóxicas contra células de carcinoma cervical humano Hela, células de tumor de vejiga humana EJ y células de carcinoma gástrico humano BCG-823. De estos triterpenoides, dos presentaron efectos citotóxicos moderados sobre las células Hela con valores de IC₅₀ de 14,1 y 54,7 mM, mientras que los otros dos fueron inactivos.

Todos los compuestos presentaron actividad sobre las células EJ y solo uno presentó actividad citotóxica sobre las células BCG-823 (Mu *et al.*, 2010).

El extracto etanólico de las raíces de la planta medicinal Egipcia *Bryonia cretica* exhibió un fuerte efecto inhibitorio sobre la proliferación de células de leucemia humana U937. A partir de este extracto se aislaron e identificaron 2 nuevos triterpenos glucósidos y 16 triterpenos glicósidos ya conocidos, de los cuales 8 fueron evaluados en sus efectos citotóxicos sobre células U937 de leucemia humana, encontrándose efectos variables para cada compuesto, con valores de IC₅₀ entre 0,22 µM y 9,4 µM (Matsuda *et al.*, 2010).

Al evaluar la citotoxicidad *in vitro* de 3 nuevos triterpenoides y 7 compuestos ya conocidos aislados a partir de la fracción etilacetato del tallo de *Camellia japonica*, sobre células de cáncer A549, LLC, HL-60 y MCF-7, utilizando el método MTT, se encontraron valores de IC₅₀ entre 21,7 y 65,4 mM (Thao *et al.*, 2010). Lo antes expuesto indica que las fracciones contentivas de terpenos provenientes de diversas partes y del látex de plantas constituyen sustancias con potencial uso farmacológico para ser utilizados como agentes quimioterapéuticos.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos se llevaron a cabo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas BIOMED de la Universidad de Carabobo-Núcleo Aragua, en el Laboratorio de Bioquímica de Proteínas y Ácidos Nucleicos. Los cultivos celulares y las pruebas de citotoxicidad se realizaron en el Laboratorio de Bioquímica Farmacológica de esta Institución. La extracción e identificación de las fracciones terpenoides se realizaron en el Centro de Bioquímica Nutricional de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela (UCV).

Material vegetal

Las muestras de látex fueron colectadas de una planta silvestre de *Calotropis procera* creciendo en el Campo Experimental de la Facultad de Agronomía, UCV, Maracay, Estado Aragua, y a partir de una planta de *Pedilanthus tithymaloides* cultivada en un jardín particular en la zona del Limón, Municipio Mario Briceño Iragorry, al norte del Estado Aragua. La correcta identificación botánica de ambas especies fue realizada por la Dra. Thirza Ruiz, del Instituto de Botánica de la Facultad de Agronomía de la UCV. El látex de ambas especies fue colectado en viales de microcentrífuga realizando escisiones en el tallo y transportado de inmediato a 4°C para obtener el extracto crudo. Para obtener la fracción metanólica con terpenos, el látex fue colectado y transportado al laboratorio a temperatura ambiente.

Preparación del extracto crudo de látex

El látex colectado fue diluido en 16 µL/mg con soluciones amortiguadoras de diferentes valores de pH con igual fuerza iónica (I=30 mM), agitado en vortex durante 1 min y centrifugado a 16.000 x G por 15 min en una microcentrífuga

Eppendorf 5415C para descartar materiales insolubles. En el cuadro 3 se presentan las características de las soluciones utilizadas en las extracciones.

El sobrenadante se denominó “extracto crudo de látex” (ECL) y fue almacenado en alícuotas a -20° C, hasta su uso, en no más de 15 días, para purificar las proteínas solubles y para los estudios de citotoxicidad.

Contenido de proteína

Se determinó el contenido de proteínas por el método de Lowry *et al.* (1951), utilizando ASB como patrón. A las fracciones de las cromatografías se les midió la DO a 260 y 280 nm, utilizando un espectrofotómetro Beckman DU 650, para estimar el contenido de proteínas a través de la siguiente ecuación:

$$[\text{Proteína}] (\text{mg/mL}) = [1,5 (A_{280}) - 0,76 (A_{260})] \quad (\text{Sambrook y Russell, 2001}).$$

Aislamiento y purificación de proteasas a partir del extracto crudo de látex de Calotropis procera y Pedilanthus tithymaloides en condiciones de pH y temperatura óptimas que conserven su actividad proteolítica.

Cromatografía líquida de intercambio iónico

El ECL, diluído en acetato de sodio 50 mM pH 5,0, se hizo pasar por columnas cromatográficas de carboximetil celulosa (CM-celulosa 52) (Whatman®), de 11 cm de longitud y 1,5 cm de diámetro, previamente estabilizadas con tampón acetato de sodio 50 mM pH 5, con un flujo de 0,8 mL/min aplicado por una bomba peristáltica BIO-RAD-Econo pump, y las proteínas fueron eluídas con un gradiente lineal de NaCl hasta 1 M.

Cuadro 3. Soluciones amortiguadoras utilizadas en la preparación de los extractos crudos de látex

Amortiguador	Concentración (mM)	pH
Acetato de sodio	206	4,0
Acetato de sodio	86	4,5
Acetato de sodio	50	5,0
Acetato de sodio	36	5,5
Fosfato de sodio	27	5,5
Fosfato de sodio	24	6,0
Fosfato de sodio	18	6,5
Tris-HCl	32	7,0
Tris-HCl	38	7,5
Tris-HCl	54	8,0
Tris-HCl	100	8,5
Tris-HCl	270	9,0

Los cálculos para la preparación de las diferentes soluciones, todas con igual fuerza iónica y diferentes valores de pH, se presentan en el Anexo 1.

Se aplicaron muestras de 6 a 7 mg de proteína y se colectaron fracciones de 1,6 mL, utilizando un colector de fracciones LKB Multirac 2111. Se utilizó un tampón de corrida de acetato de sodio 50 mM a pH 5,0 y se desarrolló un gradiente lineal por mezcla programada con el mismo tampón conteniendo NaCl 1 M.

En las muestras de ECL de *C. procera*, el gradiente se inició a los 6 min, alcanzando 0,22 M al min 7, llegando a 0,6 M de NaCl a los 95 min y luego incrementando rápidamente a 1 M de NaCl a los 100 min, para liberar polipéptidos fuertemente unidos a la matriz. En la separación del ECL de *P.tithymaloides*, el gradiente se inició a los 7 min, alcanzando 0,5 M de NaCl a los 120 min y 1 M de NaCl a los 130 min. A las fracciones colectadas se midió la DO a 260 y 280 nm para estimar el contenido de proteínas. En los cromatogramas se utilizó la DO a 280 nm como un indicativo de la presencia de proteínas en las fracciones.

En alícuotas de cada fracción, se determinó la actividad proteasa y ribonucleasa sobre caseína y ARNt^{Phe}, respectivamente. Las fracciones purificadas e identificadas fueron almacenadas a -20° C hasta su uso.

Determinación de la actividad ribonucleasa

Como consecuencia de las similitudes entre algunas enzimas proteasas y ribonucleasas (RNasas), de acuerdo a evidencias previas (Nawrot *et al.*, 2008; Dohnálek *et al.*, 2010; Rueda, 2011), se descartó contaminación con enzimas RNasas en las fracciones colectadas durante los procedimientos de separación cromatográfica, determinando la actividad, utilizando una técnica desarrollada por Rueda (2011), basada en la descrita por Arends y Schön (1997), como se describe a continuación. Brevemente, la mezcla de reacción contenía HEPES 30 mM pH 7,5, acetato de

potasio 100 mM y acetato de magnesio 3 mM, con 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del ARNt^{Phe} utilizado como sustrato, en un volumen final de 10 μL . La reacción se inició al agregar 4 μL de la fracción cromatográfica y fue incubada a 37° C durante 60 min, luego de lo cual se transfirió 5 μL de la mezcla de reacción a viales conteniendo 20 μL de tampón desnaturizante para muestras de ARN, compuesto por Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, Urea 8 M, Xylene Cyanol 0,05 % y Azul de bromofenol 0,05 % y sumergidos de inmediato en nitrógeno líquido. Se realizaron controles en los cuales la fracción cromatográfica fue añadida luego de detener la reacción. Las muestras fueron tratadas a 70° C durante 3 min, aplicadas a un gel plano de poliacrilamida-urea (cuadro 4), previamente pre-calentado durante 20 min a 300 V y sometidas a electroforesis a 300 V constantes utilizando una fuente de poder BIO-RAD Power Pac 1000. Los controles aplicados al gel contenían 50 ng de ARN sin hidrolizar.

Los geles fueron teñidos con nitrato de plata (An *et al.*, 2009) sumergiendo el gel durante 5 min en una solución fijadora de etanol 5 %, ácido nítrico 1 % y nitrato de plata 0,1 %; lavado con agua destilada y reveladas las bandas con una solución de carbonato de sodio 0,65 %, hidróxido de sodio 1,3 % y formaldehído 0,4 %. La tinción fue detenida con una solución de etanol 5 % y ácido nítrico 1 %.

La cuantificación del sustrato hidrolizado se realizó utilizando técnicas densitométricas con el programa Multianalyst en un equipo Gel Doc 1000 BIO-RAD.

La actividad se expresó como porcentaje de degradación del sustrato.

Cuadro 4. Composición de los geles de poliacrilamida-urea para electroforesis de ARN utilizados en la determinación de la actividad ribonucleasa.

Componente	Cantidad/gel	Concentración final
Acrilamida-bisacrilamida 40% (38 % acrilamida y 2 % N,N'metilenbisacrilamida)	5 mL	10 %
TBE 5X: { Tris 450 mM Acido Bórico 450 mM EDTA 10 Mm	4 mL	Tris 90 mM Acido Bórico 90 mM EDTA 2 mM
Urea	9 g	8 M
SDS al 10%	200 µL	0,1 %
Persulfato de amonio (100 mg/mL)	50 µL	0,25 mg/mL
Temed	25 µL	0,125 %
Agua bidestilada	1752 µL	
Volumen final	20 mL	

Determinación de la actividad proteasa

Se determinó la actividad proteasa sobre diversos sustratos no específicos, todos preparados al 1,25 % en el amortiguador correspondiente, previamente mencionados en el cuadro 3. La caseína fue preparada en tampón fosfato de sodio 100 mM pH 7,5, debido a su poca solubilidad en otras condiciones de pH.

Se utilizó la técnica descrita por Leighton *et al.* (1973). Cuando el sustrato utilizado fue azocaseína, a 480 μ L del sustrato previamente incubado a la temperatura seleccionada durante 10 min, se agregó una cantidad determinada de proteína en un volumen de 120 μ L ajustado con tampón, dejándose reaccionar durante 0, 2, 5, 10 o 20 min, luego de lo cual la reacción se detuvo con la adición de 600 μ L de ATC al 10 % (p/v). El contenido del tubo se centrifugó a 16.000 x G durante 10 min en una microcentrífuga Eppendorf 5415C. Del sobrenadante se tomaron 800 μ L y se agregaron 200 μ L de NaOH 1,8 N, leyéndose la DO a 420 nm, longitud de onda a la cual ocurre la máxima absorbancia del sustrato hidrolizado, en un espectrofotómetro Beckman DU 650.

La actividad se expresó como unidades de actividad proteolítica/min/mg de proteína. Una unidad de actividad proteolítica (UAP) fue definida como la cantidad de enzima que provocó el aumento de 0,01 unidades de absorbancia a 420 nm (Freitas *et al.*, 2007), en las condiciones del ensayo.

Cuando se evaluaron los sustratos caseína, ovoalbúmina y ASB, las proporciones en la mezcla de reacción fueron iguales a las utilizadas con la azocaseína. Luego de la incubación, a la temperatura seleccionada, durante 0, 2, 5, 10

o 20 min, la reacción se detuvo al añadir 600 μL de ATC al 10 % (p/v), la mezcla fue centrifugada a 16.000 x G durante 10 min y la DO a 280 nm, longitud de onda a la cual ocurre la máxima absorbancia de los aminoácidos cisteína, tirosina y triptófano, productos de la hidrólisis del sustrato, fue leída en el sobrenadante. La actividad se expresó como UAP/min/mg de proteína. Una UAP fue definida como la cantidad de enzima que provocó el aumento de 0,01 unidades de absorbancia a 280 nm en las condiciones del ensayo.

Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad proteasa

Se determinó la actividad proteasa en diferentes condiciones de pH utilizando ovoalbúmina o azocaseína al 1,25 % como sustrato. Para mantener el pH establecido, tanto el ECL como el sustrato fueron preparados en cada uno de los amortiguadores correspondientes, presentados en el cuadro 3. Se determinó la cinética enzimática tomando muestras a los tiempos de incubación indicados (0-0,5-1-1,5-2-2,5-3-5 y 10 min). La reacción se inició al agregar un volumen de ECL equivalente a 50 μg de proteína (*C. procera*) u 800 μg de proteína (*P. tithymaloides*). Los resultados de cada medición fueron graficados respecto al tiempo para determinar la velocidad inicial de proteólisis correspondiente a cada valor de pH prefijado. La pendiente de la sección de aumento lineal de absorbancia a 280 nm o 420 nm (típicamente los primeros 3 min) fue tomada como velocidad inicial de proteólisis en cada condición de pH, transformada a UAP/min y utilizada para elaborar la curva de actividad contra pH.

El efecto de la temperatura se determinó en una mezcla de reacción en la condición de pH en la cual se obtuvo la mejor actividad, para lo cual tanto el ECL como el sustrato fueron preparados en el amortiguador correspondiente, con preincubación del sustrato, durante 10 min, a las temperaturas en estudio (10-20-25-30-35-40-45-50-60-70-80 y 90° C). Se determinó la cinética enzimática tomando muestras a los tiempos de incubación indicados (0-0,5-1-1,5-2-2,5-3-5 y 10 min). La reacción se inició al agregar un volumen de ECL equivalente a 50 µg de proteína (*C. procera*) u 800 µg de proteína (*P. tithymaloides*). Se elaboraron gráficas para cada valor de temperatura evaluada. Al igual que en el caso anterior, la pendiente de la sección de aumento lineal de absorbancia/min fue tomada como velocidad de proteólisis en cada caso, transformada a UAP/min y utilizada para realizar la curva de actividad contra temperatura.

Caracterización de las enzimas proteasas por su masa molecular y presencia de glicanos.

Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las muestras fueron mezcladas en una proporción 1:1 v/v con un tampón desnaturante para proteínas, conteniendo Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; 10 % de glicerol, 5 % de β-mercaptoetanol, 2,3 % de SDS y 0,001 % de azul de bromofenol, para un volumen final de 25 µL y desnaturizadas a 97° C durante 4 min. Se utilizaron geles al 10 o al 15 % de poliacrilamida en presencia de SDS, de acuerdo a Laemmli (1970) (cuadro 5).

Cuadro 5. Composición de los geles de poliacrilamida para electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).

Componente	Cantidad/gel (μ L)	Concentración final
<u>Gel inferior (de separación)</u>		
Acrilamida-bisacrilamida 30% (29 % acrilamida y 1 % N,N'metilenbisacrilamida)	4995 ó 7500	10 ó 15 %
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	3750	375 mM
SDS al 10%	150	0,1 %
Persulfato de amonio (100 mg/mL)	150	1 mg/mL
Temed	15	0,1 %
Agua bidestilada	5940 ó 3435	
Volumen final del gel inferior	15000	
<u>Gel Superior (de empaquetamiento)</u>		
Acrilamida-bisacrilamida 30% (29 % acrilamida y 1 % N,N'metilenbisacrilamida)	830	5 %
Tris-HCl 1 M pH 6,8	630	125 mM
SDS al 10%	50	0,1 %
Persulfato de amonio (100 mg/mL)	50	1 mg/mL
Temed	5	0,1 %
Agua bidestilada	3435	
Volumen final del gel superior	5000	

Se aplicó un volumen de muestra contentivo de 10 a 20 µg de proteína dependiendo de la pureza de la muestra. Las electroforesis se efectuaron a corriente constante, utilizando una fuente de poder BIO-RAD Power Pac 1000, (20 mA durante el empacamiento en el gel de concentración y en el gel de corrida). El tampón de migración contenía Tris 25 mM pH 8,3; glicina 250 mM y 0,1 % de SDS. Después de finalizada la SDS-PAGE los geles fueron sumergidos en una solución con 0,25 % de azul de Coomassie R250, 50 % de metanol y 5 % de ácido acético durante toda la noche con agitación suave. Posteriormente se realizaron dos lavados del gel con solución decolorante (10 % de etanol y 7 % de ácido acético), luego de lo cual se dejó en solución decolorante a 40° C, con agitación moderada, durante 30 min o hasta que se observaron con nitidez las diferentes bandas y se aclaró el fondo.

Cuando las cantidades de proteínas dispuestas en el gel de SDS-PAGE fueron menores a 10 µg, los geles fueron teñidos con nitrato de plata de acuerdo a la metodología de Wray *et al.* (1981) con algunas modificaciones. Brevemente, los geles fueron fijados durante 20 min en ATC al 10 %, sumergidos en una solución conteniendo 10 % de etanol y 7 % de ácido acético durante 10 min, lavados con dicromato de potasio 0,1 % y ácido nítrico 0,01 % durante 20 min e incubados durante 30 min en una solución de nitrato de plata 0,1 % protegido de la luz. Las bandas fueron reveladas con una solución de carbonato de sodio al 3 % y formaldehído 0,5 mL/L realizando cambios contínuos hasta la aparición de las bandas. La reacción se detuvo con ácido acético al 5 %.

Determinación de la masa molecular

Alícuotas de ECL y fracciones cromatográficas fueron aplicadas sobre geles de poliacrilamida al 15% conjuntamente con marcadores de masa molecular de proteínas (Promega V8491). Adicionalmente, se aplicó al gel dos proteínas de masa molecular conocida, ASB (Sigma®) (66 kDa) y Con A (Amersham®) (26 kDa). Luego de realizar la SDS-PAGE, los geles fueron teñidos con azul de Comassie y se estimó la masa molecular de las proteínas a través de la relación entre la distancia de migración (movilidad relativa) de las proteínas y las proteínas de masa molecular conocida, para lo cual se realizó una gráfica representando el Logaritmo (Log) de la masa molecular en función de la distancia de migración y se utilizó la ecuación de regresión lineal para realizar las estimaciones (Weber y Osborn, 1969).

Prueba de glicosilación

Para identificar la presencia de proteínas glicosiladas en los ECL y en las fracciones purificadas por cromatografía de intercambio iónico se realizó una prueba de glicosilación utilizando el kit de detección de glicoproteínas Glycopro Sigma® de acuerdo a las instrucciones del fabricante, aplicado sobre un gel de SDS-PAGE al 15 %. La prueba proporciona un sistema de detección de azúcares de glicoproteínas basado en el sistema de Ácido periódico-Schiff (PAS) y produce bandas de color rosado, con un límite de detección en un rango entre 25 y 100 ng de carbohidratos, dependiendo de la naturaleza y el grado de glicosilación de la proteína. Se utilizó como control positivo la proteína glicosilada peroxidasa de rábano picante

(*Armoracia rusticana*), que contiene 16 % de carbohidratos, suministrada por el fabricante.

Preparación de una fracción enriquecida en terpenos a partir de los látices de Calotropis procera y Pedilanthus tithymaloides.

Preparación del extracto metanólico de látex

El látex colectado para extraer la fracción con terpenos fue colocado en cápsulas de porcelana, secado en una estufa Memmert a 37° C durante 24 horas y extraído con metanol, en una proporción 1:4 p/v, a temperatura ambiente, con agitación en vortex durante 15 min. El extracto fue filtrado en papel Whatman N° 1, distribuido en viales a razón de 1 mL/vial y colocados en la estufa a 37° C con la finalidad de evaporar la totalidad del metanol, hasta obtener un residuo gomoso contentivo de terpenos y trazas de otros compuestos de naturaleza hidrofóbica, de acuerdo a Ravikant *et al.* (2002). Se determinó la cantidad de extracto metanólico por doble pesaje de los viales, vacíos y después de la evaporación del metanol y se expresó en % p/v. Los viales que contenían el extracto metanólico de látex (EML) fueron almacenados a -20° C hasta su uso. Para las pruebas de identificación de fracción terpenoide fueron resuspendidos en 1 mL de cloroformo: metanol (2:1). Para los estudios de citotoxicidad fueron resuspendidos en DMSO para lograr las concentraciones requeridas.

Identificación de la fracción terpénica

Para identificar la presencia y estimar el contenido de terpenos en los EML se realizó la prueba de determinación colorimétrica de Liebermann-Burchard (Kenny,

1952). Los extractos positivos a la reacción de Libermann-Burchard indican la presencia de saponinas triterpenoides o saponinas esteroidales (Mu *et al.*, 2010). Las muestras secas se disolvieron en 1 mL de una solución de cloroformo: metanol (2:1). El procedimiento se inició con 0,4 mL de muestra a la que se agregó 1 mL de ácido *p*-tolueno sulfónico preparado al 13 % en cloroformo: metanol (2:1). Inmediatamente se añadió 3 mL de anhídrido acético, se agitó la mezcla, se disminuyó la temperatura del tubo de reacción sumergiéndolo en hielo y se añadió 0,4 mL de ácido sulfúrico concentrado mantenido a 4° C, procediéndose a mezclar nuevamente y dejar en reposo a temperatura ambiente durante 20 min. La formación de color ámbar a verde oscuro indicó una reacción positiva, correspondiente a una fracción enriquecida con terpenos. El colesterol fue utilizado a una concentración de 3 mg/mL como un control cualitativo, para validar la prueba.

Evaluación de la actividad citotóxica in vitro del extracto crudo y de las fracciones aisladas de proteasas y enriquecidas en terpenos, de los látices de Calotropis procera y Pedilanthus tithymaloides.

Líneas celulares y cultivos

Las líneas celulares Jurkat (leucemia de linfocitos T humanos) fueron obtenidas de la colección del Laboratorio de Bioquímica Farmacológica del Instituto de Investigaciones Biomédicas BIOMED de la Universidad de Carabobo, Estado Aragua. Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma®. Las células fueron mantenidas en medio básico RPMI-1640 con rojo de fenol, 0,2 % de bicarbonato de sodio, suplementado con 4 mM de L-glutamina, 10 % de SFB, penicilina (100 u/mL)

y estreptomicina (100 µg/mL) a 37° C en 5 % de CO₂ en un incubador Nuair NU-8500.

Estudios de citotoxicidad

La citotoxicidad de los ECL de *C.procera* y *P. tithymaloides* y de las fracciones purificadas de proteasas y terpenos fue probada en líneas celulares Jurkat.

a.- Viabilidad y proliferación celular

Se realizaron ensayos de viabilidad y proliferación celular utilizando la técnica de reducción, por acción de la enzima succinato-tetrazolio-reductasa mitocondrial, dependiente del NADH+H⁺, del colorante MTT, inicialmente de color amarillo, tornándose de color púrpura al ser reducido. La actividad metabólica de las células Jurkat viables se utiliza como medida de la citotoxicidad y proliferación celular, basado en que las células en proliferación son más activas que las que no proliferan o están latentes, por lo cual la intensidad del color púrpura es proporcional al número de células viables y activas (Mosmann, 1983). Brevemente, se incubó, en placas de 96 pozos fondo en U, 192 µL de suspensión celular a una concentración inicial de 250 x 10³ cel/mL suspendidas en el medio RPMI suplementado con 4 mM de L-glutamina, 10 % de SFB, penicilina (100 u/mL) y estreptomicina (100 µg/mL) a las cuales se agregó, después de 24 horas, 8 µL del ECL, preparado, en acetato de sodio 50 mM pH 5, a la concentración requerida para dar una concentración final de proteínas de 1-10-50 y 100 µg/mL o de la fracción purificada por cromatografía. Cuando se evaluaron los EML las concentraciones de terpenos se calcularon para agregar 1 µL diluído en DMSO para una concentración final de 1-10-50 y 100 µg/mL. Luego de 0, 24 y 48 horas de incubación a 37° C en 5 % CO₂ se transfirieron

100 μ L de suspensión celular a placas de fondo plano de 96 pozos en los cuales se añadió 10 μ L de solución MTT 5 mg/mL. Se incubó la placa por 4 horas a 37° C y 5 % CO₂ luego de lo cual se añadió 100 μ L de solución detergente preparada con 10 % de Tritón X-100 y 0,1 M de HCl en isopropanol, agitando hasta la disolución total de los cristales púrpura de formazán, formados al reducirse el colorante MTT. Luego de 2 min de agitación a 840 r.p.m. y 2 min de reposo se leyó la DO a 550 nm, longitud a la cual ocurre la máxima absorbancia del MTT reducido, en un fotómetro de placa Labsystems Multiskan Ascent. El efecto citotóxico de las fracciones evaluadas fue expresado como viabilidad en porcentaje con respecto al control a las 24 y 48 h y como Índice de Proliferación (IP) relacionando la DO correspondiente a la reducción de la tintura MTT a 550 nm con respecto al control a la hora cero. En cada caso se realizaron controles en los cuales el ECL o las fracciones purificadas fueron sustituidos por la misma cantidad de acetato de sodio 50 mM pH 5. Cuando se evaluó la fracción terpénica se realizaron controles con DMSO, en cuyo caso se utilizó siempre a una concentración de 0,5 % para evitar riesgos de toxicidad por el DMSO (Tseng y Safa, 1983).

b.- Necrosis y apoptosis celular

Exclusión del azul tripano

La prueba de exclusión del azul tripano se basa en que las células viables no permiten que el colorante ingrese al citosol, contrario a las células necróticas o no viables, en las cuales la membrana celular ha sufrido daños, perdiendo su característica permeabilidad selectiva, por lo cual el colorante ingresa al citosol,

tiñéndolo de color azul. De esta manera, las células de color azul, a la vista en un microscopio de luz visible, corresponden a las no viables (Hathaway *et al.*, 1964).

Para estos experimentos, se colocaron 96 μL de suspensión celular a una concentración inicial de 10^6 células/mL de medio específico y 4 μL de ECL o fracción cromatográfica a diferentes concentraciones (0,1-0,5-1-10-50-100-150 y 200 μg de proteína /mL) en una placa de 96 pozos fondo en U. Después de 24 horas de incubación a 37°C y 5 % CO_2 en un incubador Nuaire NU-8500 se tomaron alícuotas de 20 μL de la suspensión celular y se mezclaron con 20 μL de una solución de azul tripano al 0,25 % (p/v) preparada en tampón PBS para realizar las mediciones de viabilidad celular a través de la prueba de exclusión del colorante utilizando una cámara de Neubauer y un microscopio óptico Zeiss AxioLab con un objetivo de 20X. El vehículo de disolución de cada fracción fue utilizado como control positivo (acetato de sodio 50 mM pH 5 para el ECL y para las fracciones cromatográficas). El efecto citotóxico fue expresado como tasa de necrosis celular relativa, usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de necrosis} = (\text{N}^\circ \text{ de células no viables} / \text{N}^\circ \text{ total de células}) \times 100$$

Fluorescencia con naranja de acridina/bromuro de etidio

La técnica de exclusión del azul tripano no permite distinguir entre las células necróticas y apoptóticas debido a que, en ambos casos, el colorante ingresa al citosol.

La condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear son características de las células apoptóticas. La microscopia de fluorescencia con transporte diferencial de tinturas que unen ADN fluorescente (tales como naranja de acridina y bromuro de etidio) es un método caracterizado por ser relativamente

sencillo y preciso. En estos ensayos, el índice apoptótico y la integridad de la membrana celular pueden ser evaluados simultáneamente sin un paso previo de fijación, disminuyendo los posibles errores durante la identificación de las células. La naranja de acridina (NA) entra a todas las células y tiñe al núcleo de verde. El bromuro de etidio (BE) es sólo tomado por las células cuando se pierde la integridad de la membrana citoplasmática y tiñe el núcleo de rojo ladrillo. El BE domina sobre NA. Así, las células vivas se observan al microscopio de fluorescencia con un núcleo verde normal, las células apoptóticas tempranas con núcleo verde brillante y cromatina condensada o fragmentada; las células apoptóticas tardías tienen cromatina naranja fragmentada y condensada; y las células que han muerto por necrosis tienen un núcleo rojo ladrillo estructuralmente normal (Renvoize *et al.*, 1998).

Para determinar el porcentaje de necrosis y apoptosis, se realizaron experimentos en iguales condiciones a las utilizadas en las pruebas de exclusión del azul tripano, con 24 horas de incubación a 37° C y 5 % CO₂ en un incubador Nuair NU-8500, en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de ECL (1-10-50 y 100 µg de proteína/mL), luego de lo cual se tomaron alícuotas de 25 µL de suspensión celular a las que se añadió 1 µL de una solución conteniendo 10 mg/mL de bromuro de etidio y 10 mg/mL de naranja de acridina. Un volumen de 10 µL de esta mezcla fue colocado entre lámina y laminilla y examinado con objetivo seco de 40X utilizando epiiluminación en un microscopio de Fluorescencia Leica DMLS para identificar y contar las células viables, necróticas y apoptóticas. Se realizaron controles en presencia de 0,5 % de DMSO o Acetato de sodio 50 mM pH 5,0. El

efecto fue expresado como viabilidad, necrosis o apoptosis celular relativa usando las siguientes fórmulas, respectivamente:

$$\% \text{ de células viables} = (\text{N}^\circ \text{ de células viables} / \text{N}^\circ \text{ total de células}) \times 100$$

$$\% \text{ de células necróticas} = (\text{N}^\circ \text{ de células necróticas} / \text{N}^\circ \text{ total de células}) \times 100$$

$$\% \text{ de células apoptóticas} = (\text{N}^\circ \text{ de células apoptóticas} / \text{N}^\circ \text{ total de células}) \times 100$$

Diseño experimental y análisis estadístico

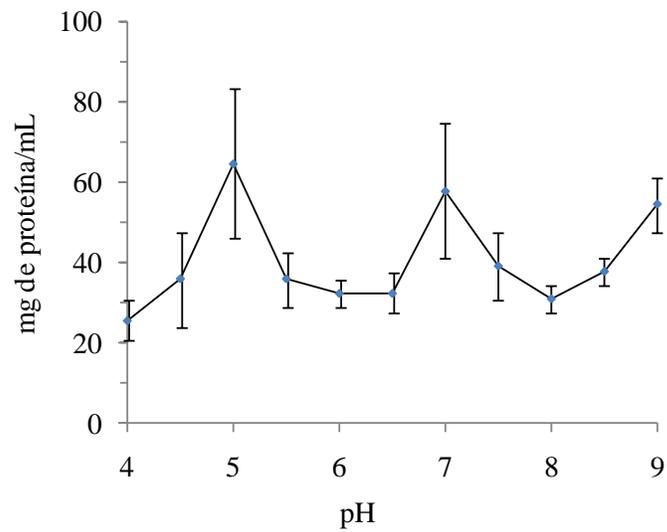
Todos los experimentos se realizaron con un diseño completamente al azar. Los datos son presentados como promedio \pm desviación estándar. Los datos de los experimentos de citotoxicidad fueron analizados por análisis de varianza (ANAVAR) y una prueba de medias de Dunnett a un nivel de significancia de 0,05. Se utilizó el Programa Statistix 8.0.

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de proteína

A partir del látex de ambas especies se realizó la extracción de proteínas solubles. Como primer paso, el látex fue diluído en una proporción 1:16 p/v a una fuerza iónica de 30 mM. La extracción de proteínas solubles varió dependiendo de la solución amortiguadora utilizada al diluir el látex. En ambas especies se presentó variabilidad a diferentes condiciones de pH y fue mayor la extracción cuando se utilizó el tampón acetato de sodio 50 mM pH 5 (figura 4). El contenido promedio de proteína del extracto soluble del látex de las plantas en estudio fue de $40,5 \pm 8,2$ mg/mL en el látex de *C.procera* y de $60,8 \pm 14,0$ mg/mL en el látex de *P. tithymaloides*. En látex de plantas de *C. procera* creciendo de forma silvestre en llanuras de Brasil, Freitas *et al.* (2007) reportaron un contenido de proteínas 2,9 veces menor al encontrado en el presente estudio. Estas diferencias pueden ser derivadas de las condiciones agroecológicas de las regiones. Al evaluar el efecto de varios factores sobre la composición del látex de *Hevea brasiliensis*, Moreno *et al.* (2005) reportaron variaciones en el contenido de nitrógeno, proveniente principalmente de las proteínas y aminoácidos libres, dependientes de la temperatura ambiental, las precipitaciones y el estado fisiológico de la planta. El contenido de N tiende a ser mayor al disminuir la temperatura y durante las épocas lluviosas. Con el inicio de los procesos de floración y fructificación, se hace un mayor uso del N por lo que disminuye su contenido en el látex (Moreno *et al.*, 2005). No se encontró en la literatura información acerca de estudios que indiquen el contenido de proteínas en el látex de *P. tithymaloides* u otras especies laticíferas.

A



B

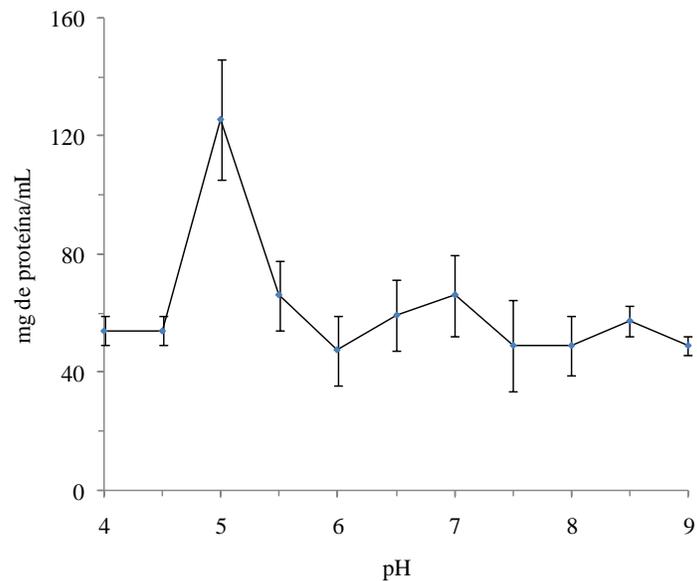


Figura 4. Extracción de proteínas de látex. (A) *Calotropis procera*. (B) *Pedilanthus tithymaloides*. Las extracciones se realizaron utilizando diversas soluciones amortiguadores, con variadas condiciones de pH, manteniendo iguales condiciones de fuerza iónica ($I= 30$ mM), en $16 \mu\text{L}/\text{mg}$ de látex, con agitación en vortex durante 1 min y centrifugado a $16.000 \times G$ por 15 min descartándose el precipitado. Los datos se expresan como promedios \pm DE de un total de 6 repeticiones, por triplicados.

Determinación de la actividad proteasa

Al evaluar la actividad proteasa de los ECL de las especies en estudio, se realizaron pruebas con diversos sustratos, concentraciones de proteína, condiciones de pH y temperatura.

Calotropis procera

El ECL de *C. procera* presentó actividad proteolítica sobre ovoalbúmina, caseína azocaseína y ASB. Experimentos para comprobar que los incrementos cuantificados en la DO fueron consecuencia de la hidrólisis de la ovoalbúmina se realizaron midiendo la actividad en mezclas de reacción conteniendo el amortiguador y el sustrato ó el amortiguador y el ECL, observándose resultados como los presentados en la figura 5, en la cual se evidencia que, efectivamente, los incrementos en la absorbancia se producían como consecuencia de la actividad proteasa del ECL.

Al evaluar la actividad proteasa sobre la ovoalbúmina (figura 6) se encontró linealidad durante los primeros 3 min de incubación e incrementos en la actividad al aumentar la concentración de las proteínas laticíferas en el medio de reacción. Un incremento de tres, cuatro y hasta cinco veces en la concentración de la enzima, manteniendo constante la concentración del sustrato, provocó aumentos equivalentes a 1,3; 1,6 y 1,9 veces en la actividad, durante el primer minuto de incubación. A partir de estos resultados se decidió utilizar, en las subsiguientes determinaciones de actividad proteolítica sobre otros sustratos, concentraciones de 0,1 mg/mL de proteína laticífera y de 10 mg/mL de sustrato en la mezcla de reacción, lográndose mantener, con estas proporciones, una adecuada relación enzima/sustrato y actividad en un rango

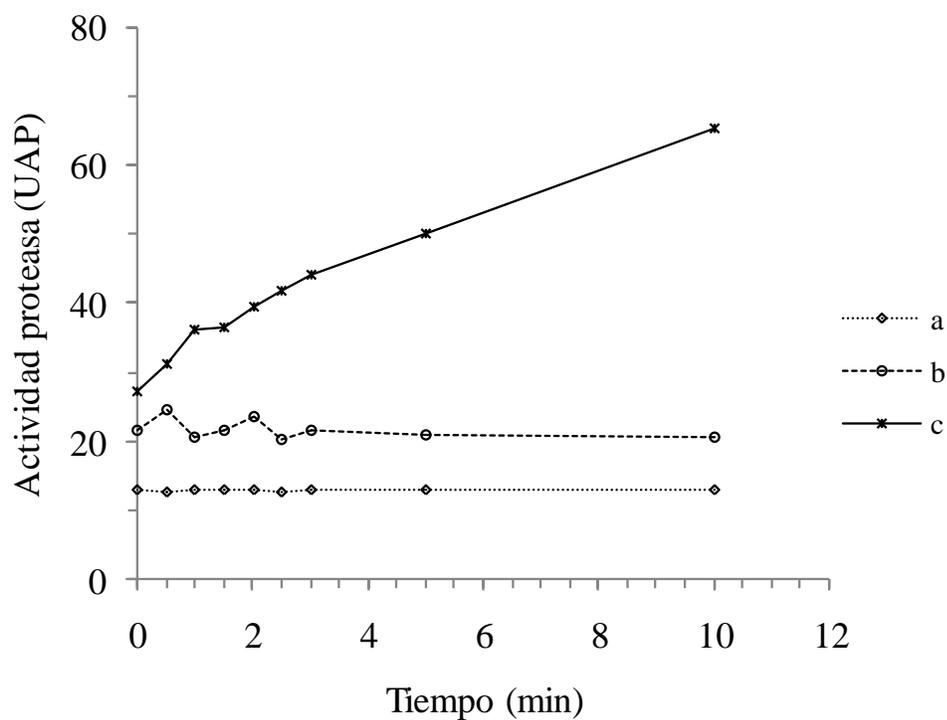


Figura 5. Cinética de la actividad proteasa del extracto crudo de látex (ECL) de *Calotropis procera* sobre ovoalbúmina a 60° C. Las letras en minúscula indican que la mezcla de reacción contenía: a) amortiguador y ECL, b) amortiguador y sustrato y c) amortiguador, ECL y sustrato. Las concentraciones de sustrato y proteína laticífera fueron de 10 mg/mL y 0,1 mg/mL respectivamente, en acetato de sodio 36 mM pH 5,5.

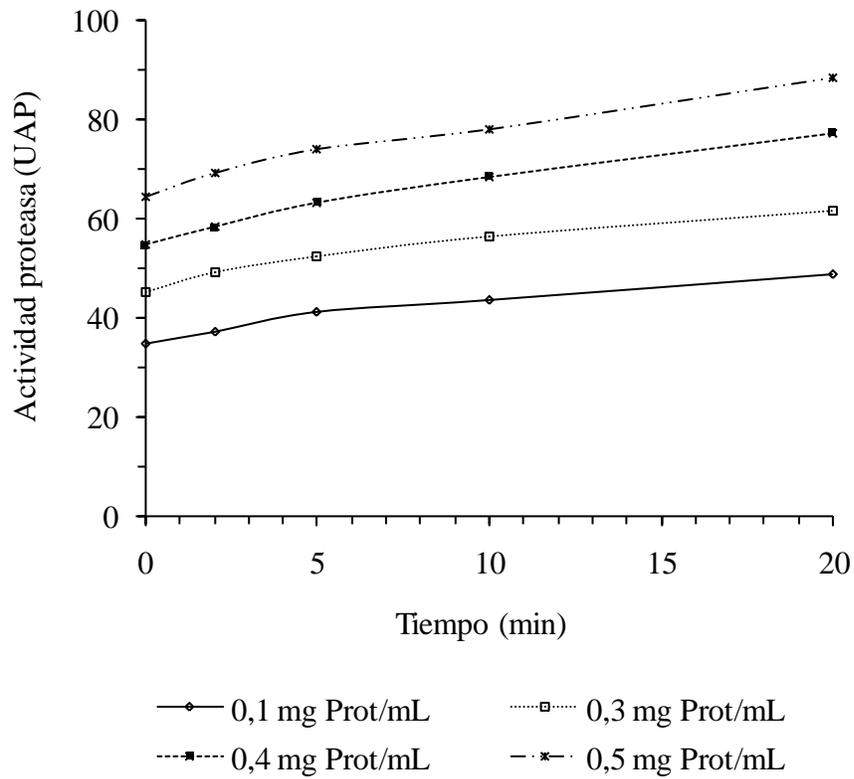


Figura 6. Actividad proteasa del extracto crudo de látex (ECL) de *Calotropis procera* sobre ovoalbúmina. Todos los experimentos con diferentes concentraciones de proteína laticífera, a 41° C, en acetato de sodio 36 mM pH 5,5 en una mezcla de reacción conteniendo una concentración final de sustrato de 10 mg/mL. Cada valor es el promedio de 3 repeticiones en iguales condiciones.

lineal. En la figura 7, se presenta la actividad proteasa del ECL sobre ovoalbúmina, caseína y azocaseína, observándose mayor actividad sobre ovoalbúmina durante los primeros 3 min de reacción, con 18,65 UAP/min. Sobre caseína y azocaseína la actividad fue de 8,9 y 11,74 UAP/min respectivamente, en ambos casos con una tendencia lineal durante 10 min de incubación.

Pedilanthus tithymaloides

El ECL de *P. tithymaloides* no presentó actividad proteolítica sobre ovoalbúmina ni sobre ASB, pero si hidrolizó los sustratos caseína y azocaseína.

Se realizaron experimentos para comprobar que los incrementos en la DO se producían como consecuencia de la liberación de aminoácidos por acción de la enzima proteolítica sobre caseína (figura 8). Mezclas de reacción incubadas durante iguales intervalos de tiempo a igual temperatura, conteniendo sólo el amortiguador y el sustrato o el amortiguador y el ECL presentaron lecturas de absorbancia entre 6 y 35 veces por debajo de las observadas en la mezcla completa de reacción conteniendo el amortiguador, el sustrato y el ECL, indicando que, efectivamente, los aumentos de DO con el tiempo son producto de la liberación de aminoácidos, al medio de reacción, proveniente de la hidrólisis enzimática.

La actividad fue semejante sobre caseína y azocaseína, con 4,6 y 4,5 UAP/min respectivamente, y, en ambos casos, presentó tendencia lineal durante los primeros 20 min de incubación a 41° C, como se observa en la figura 9.

Para los subsiguientes estudios de efectos del pH y la temperatura, se seleccionó la azocaseína como sustrato debido a la mejor disolución de este sustrato en diversas condiciones de pH, en comparación con la caseína.

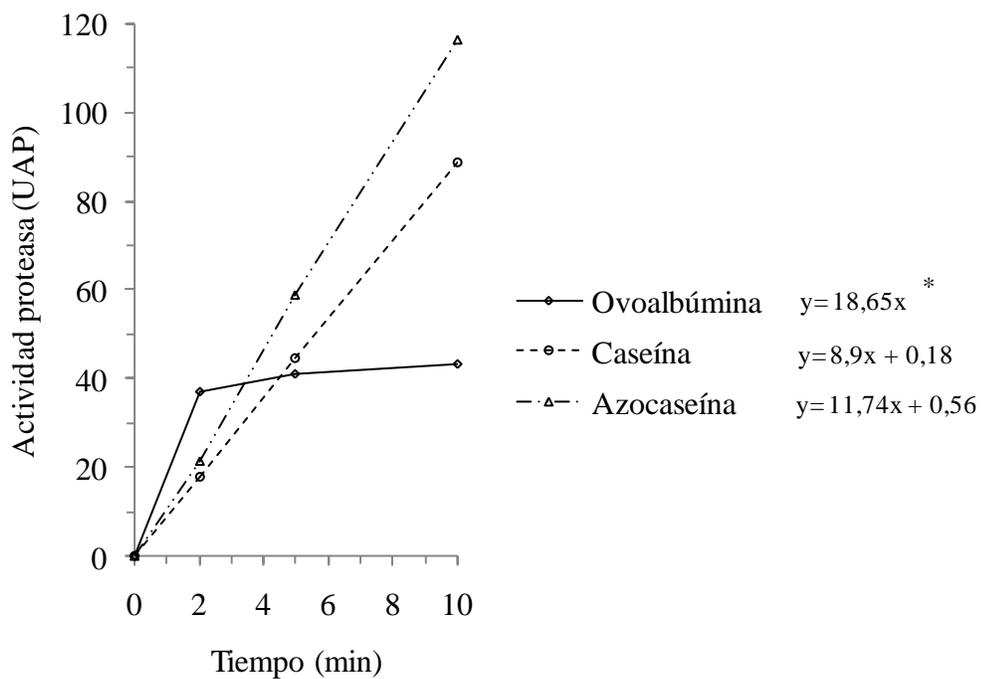


Figura 7. Actividad proteasa del extracto crudo de látex de *Calotropis procera* sobre diversos sustratos. Todos los experimentos se realizaron a 41° C, en una mezcla de reacción conteniendo una concentración final de sustrato de 10 mg/mL y 0,1 mg/mL de proteína laticífera en acetato de sodio 36 mM pH 5,5. Cuando el sustrato fue caseína se utilizó en fosfato de sodio 100 mM pH 7,5. Cada valor es el promedio de 3 repeticiones, por duplicado, en iguales condiciones. *Ecuación correspondiente al rango lineal.

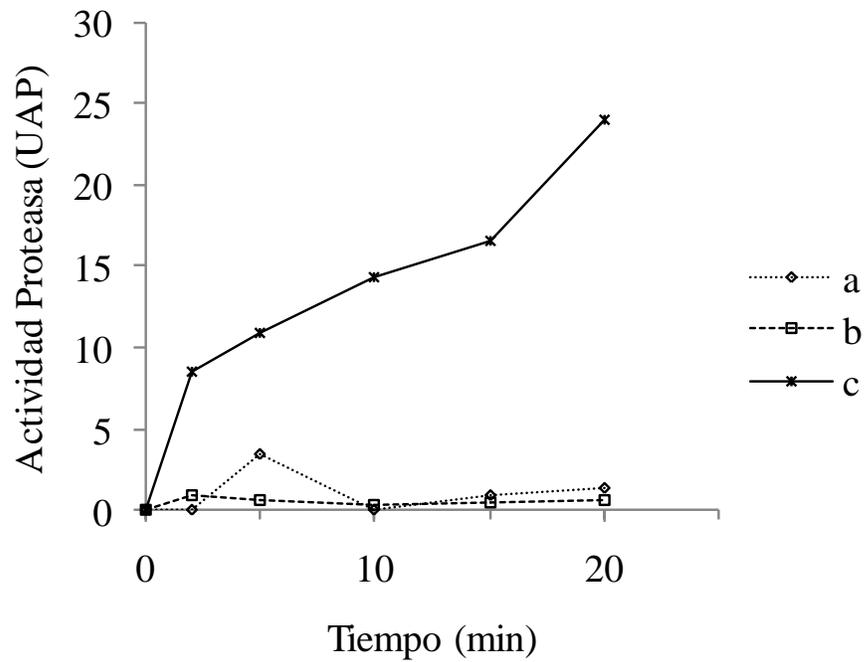


Figura 8. Cinética de la actividad proteasa del extracto crudo de látex (ECL) de *Pedilanthus tithymaloides* sobre caseína. Condiciones: 41°C en fosfato de sodio 100 mM pH 7,5 con 0,2 mg de proteína/mL y una concentración de sustrato de 10 mg/mL en la mezcla de reacción. Mezcla de reacción con (a) amortiguador y ECL, (b) amortiguador y caseína (c) amortiguador, ECL y caseína. Cada valor es el promedio de 3 repeticiones en iguales condiciones.

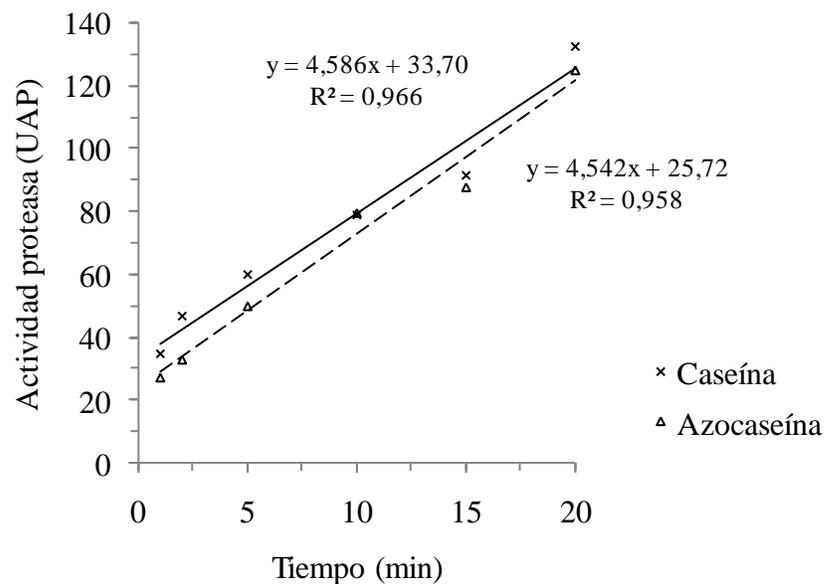


Figura 9. Actividad proteasa del extracto crudo de látex (ECL) de *Pedilanthus tithymaloides* sobre caseína y azocaseína. Se realizaron experimentos en iguales condiciones de temperatura (41°C) hasta 20 min de incubación. Los sustratos fueron preparados en fosfato de sodio 100 mM pH 7,5 (caseína) y Tris-HCl 54 mM pH 8 (azocaseína). Se utilizó una concentración de sustrato de 10 mg/mL y 1,3 mg/mL de proteína laticífera en la mezcla de reacción. Cada punto se realizó por triplicado.

Experimentos realizados con concentraciones crecientes de proteína laticífera permitieron definir las concentraciones a utilizar en los subsiguientes experimentos, de 1,3 mg/mL de proteína laticífera y de 10 mg/mL de sustrato en la mezcla de reacción.

Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad proteasa

Calotropis procera

Para evaluar el efecto del pH sobre la actividad proteasa del ECL de *C. procera*, se utilizó como sustrato la ovoalbúmina, por presentar mejor solubilidad en las diversas condiciones de pH. Otros sustratos, como la caseína y la azocaseína, presentan limitaciones de solubilidad en medio ácido. Adicionalmente, la actividad sobre ovoalbúmina fue mayor en los primeros 3 min de reacción, utilizados para determinar la velocidad inicial de la reacción. En la figura 10, se presenta una gráfica representativa del efecto del pH, a 41° C, sobre la actividad proteasa. Se encontraron cambios en la velocidad inicial dependientes del pH, con valores menores en las condiciones ácidas (pH 4 y 4,5) y alcalinas (pH 8,5 a 9), con mayor actividad a pH 5 y valores semejantes entre 5,5 y 8. Los tres puntos de inflexión podrían corresponder a diferentes proteasas presentes en el ECL, como ha sido reportado por otros autores (Freitas *et al.*, 2007). Asimismo, el pH óptimo coincide con lo reportado por Freitas *et al.* (2007), al evaluar el efecto de la temperatura sobre azocaseína en proteínas laticíferas de *C. procera*.

Se observó un aumento de la velocidad inicial de proteólisis con la temperatura, hasta los 70° C, a partir de los cuales comenzó a descender (figura 11 A). La tendencia es exponencial en la porción ascendente de la curva (figura 11 B).

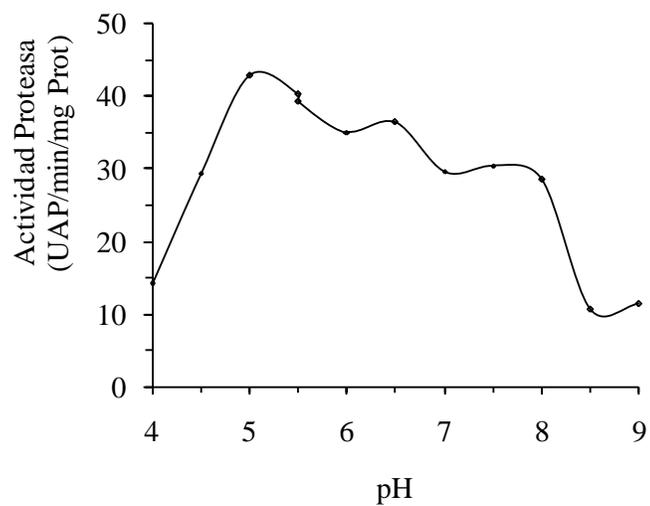
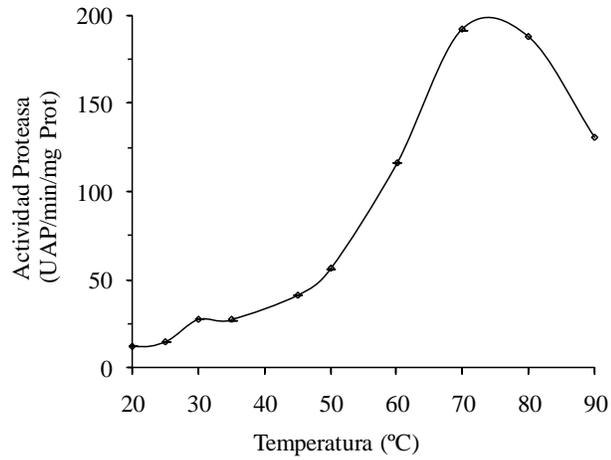


Figura 10. Efecto del pH sobre la actividad proteasa del látex de *Calotropis procera*. Se utilizó ovoalbúmina como sustrato, a 41°C, en diversas condiciones de pH. La mezcla de reacción contenía concentraciones de sustrato y proteína laticífera de 10 mg/mL y 0,1 mg/mL respectivamente. Cada punto se realizó por triplicado.

A



B

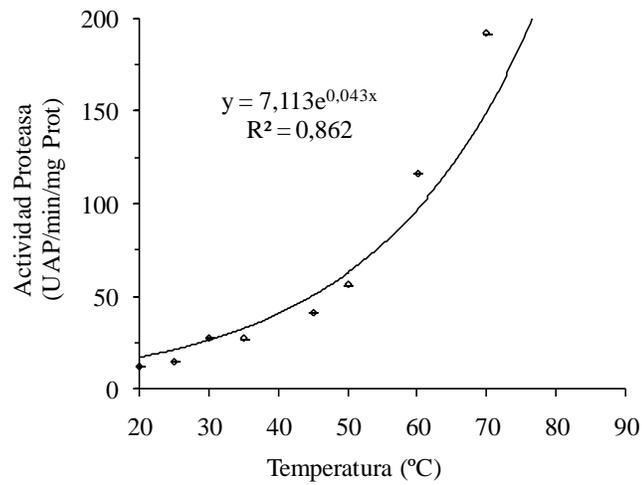


Figura 11. Efecto de la temperatura sobre la actividad proteasa del látex de *Calotropis procera*. A. Curva de velocidad inicial. B. Línea de tendencia. Se utilizó ovoalbúmina como sustrato preparada en fosfato de sodio 27 mM pH 5,5. La mezcla de reacción contenía concentraciones de sustrato y proteína laticífera de 10 mg/mL y 0,1 mg/mL respectivamente. Cada punto se realizó por triplicado.

De acuerdo a estos resultados, la temperatura óptima de proteólisis enzimática está cercana a los 70° C, lo que permitiría caracterizar a estas enzimas como termoestables, posiblemente comparables a las encontradas en algunos microorganismos termofílicos (Haki y Rakshit, 2003).

Pedilanthus tithymaloides

Las figuras 12 y 13 A, presentan las gráficas correspondientes a la actividad proteasa del ECL de *P. tithymaloides* sobre el sustrato azocaseína, preparado a una concentración de 1,25 % en el tampón correspondiente, en función de diversas condiciones de pH y temperatura. La actividad fue máxima a pH 8,5 y 70 °C. La tendencia de la velocidad inicial de la reacción enzimática, en función de la temperatura, es exponencial (figura 13 B). Hasta la fecha, se ha reportado una proteasa aislada de *P. tithymaloides*, denominada pedilanthina, con condiciones óptimas de pH entre 8 y 9,5 y temperatura óptima entre 65 y 70° C sobre azoalbúmina (Bhowmick *et al.*, 2008), semejante a lo encontrado en el presente trabajo. En el ECL es muy probable la presencia de diversas enzimas con actividad proteasa, tal como se ha evidenciado en distintas especies laticíferas, como calotropina DI y DII en *Calotropis gigantea* (Sengupta *et al.*, 1984), ervatamina A, B o C en *Ervatamia coronaria* (Nallamsetty *et al.*, 2003; Kundu *et al.*, 2000; Takhurta *et al.*, 2004) o caricaína, papaína y quimopapaína en *Carica papaya* (Azarcán *et al.*, 2003), todas por lo general perteneciendo a un mismo tipo de proteasa. En los ejemplos anteriores, todas corresponden al tipo cisteína proteasas, con rangos semejantes entre sí de pH y temperatura óptimos. Las condiciones de pH óptimo para la mayoría de las cisteína proteasas reportadas hasta la fecha se ubican entre 6 y 8 (Kundu *et al.*, 2000;

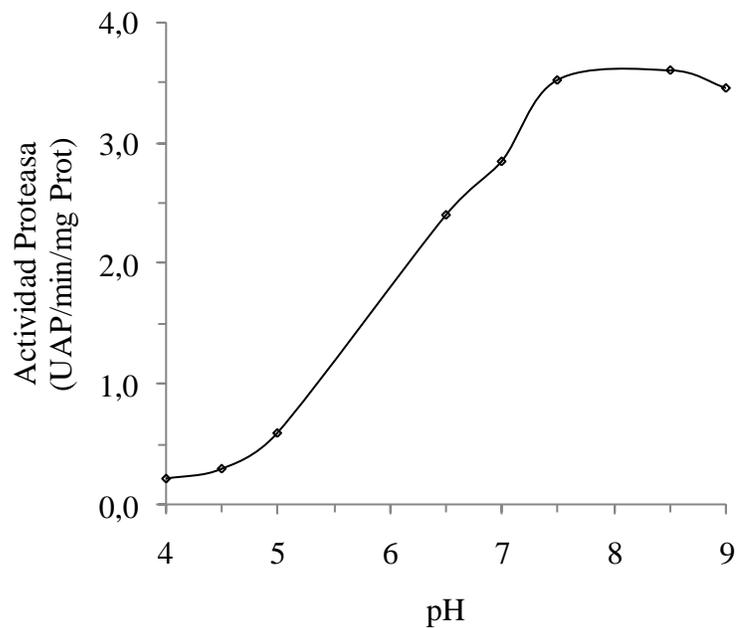
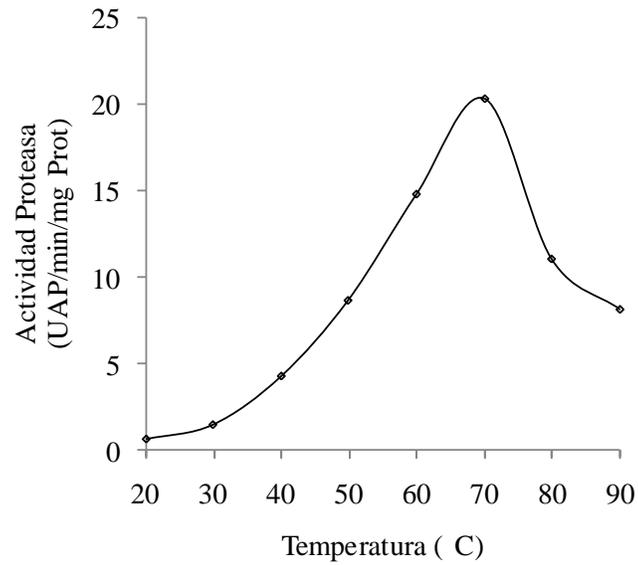


Figura 12. Efecto del pH sobre la actividad proteasa del extracto crudo de látex de *Pedilanthus tithymaloides*. Se utilizó azocaseína como sustrato, a 41° C, preparado en diversas condiciones de pH. La mezcla de reacción contenía concentraciones de sustrato y proteína laticífera de 10 mg/mL y 1,3 mg/mL, respectivamente. Cada punto se realizó por triplicado.

A



B

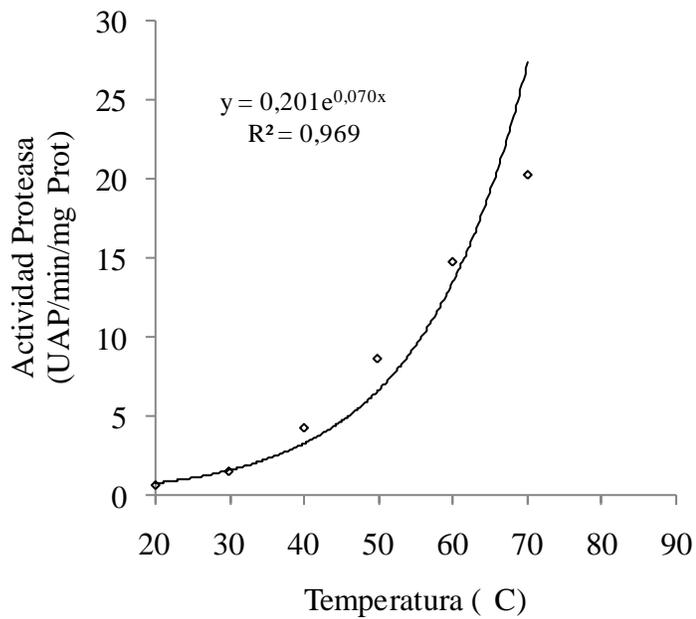


Figura 13. Efecto de la temperatura sobre la actividad proteasa del extracto crudo de látex de *Pedilanthus tithymaloides*. A. Curva de velocidad inicial. B. Línea de tendencia. Se utilizó azocaseína como sustrato, preparada en Tris-HCl 100 mM pH 8,5. La mezcla de reacción contenía concentraciones de sustrato y proteína laticífera de 10 mg/mL y 1,3 mg/mL, respectivamente. Cada punto se realizó por triplicado.

Morcelle *et al.*, 2004; Sugiura y Sazaki, 1973; Sengupta *et al.*, 1984; Takhurta *et al.*, 2004). No obstante, el valor óptimo de pH encontrado en el ECL en el presente trabajo se aproxima más a los reportados para serina proteasas, como en el caso de la indicaína en *Morus indica* (Sing *et al.*, 2008) y cryptolepaína en *Cryptolepis buchani* (Pande *et al.*, 2006). Asimismo, la temperatura óptima de actividad proteasa se asemeja a la reportada para las serina-proteasas wrightina en *Wrightia tinctoria* (Tomar *et al.*, 2008) y cryptolepaína en *Cryptolepis buchani* (Pande *et al.*, 2006). En las cisteína-proteasas las temperaturas óptimas suelen estar en un rango menor de temperatura, entre 50 y 60° C (Sugiura y Sazaki, 1973; Sengupta *et al.*, 1984; Nallamsetty *et al.*, 2003; Kundu *et al.*, 2000; Takhurta *et al.*, 2004; Dubey y Jagannadham, 2003).

Cromatografía líquida de intercambio iónico

Calotropis procera

Durante los procedimientos de separación cromatográfica fue evidente la existencia de 2 proteínas que eluían muy cercanas entre sí, corroborándose este hallazgo con las observaciones derivadas de las SDS-PAGE. Al realizar mediciones de actividad se evidenció la existencia de actividades enzimáticas diferentes, por lo que fue necesario caracterizar estas actividades y lograr la separación de ambas, lo que efectivamente fue alcanzado exitosamente realizando separaciones cromatográficas de intercambio iónico, después de realizar los procesos de estandarización correspondientes y probar diferentes gradientes de elución. Los resultados presentados en la figura 14, indican la recuperación de fracciones con actividad proteasa diferentes de otras con actividad RNasa, con tendencia a eluir

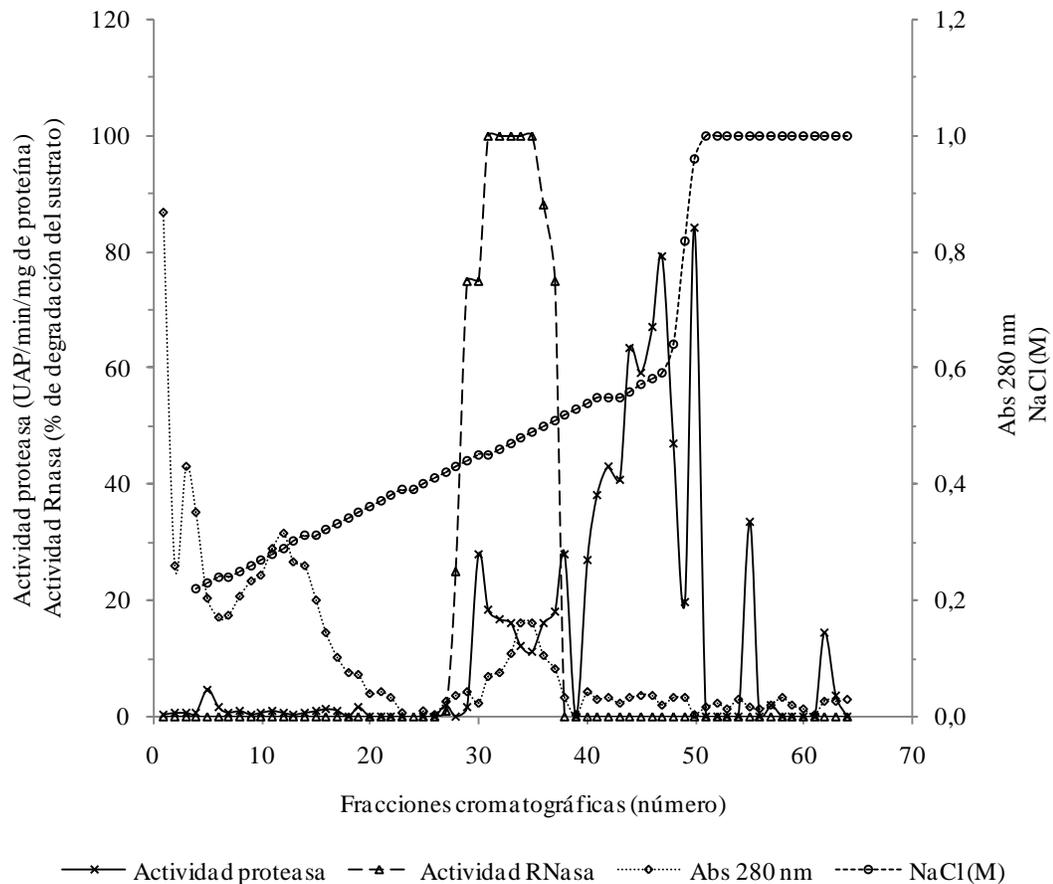


Figura 14. Separación cromatográfica del extracto crudo de látex de *Calotropis procera*. Se indica la A_{280} nm de las fracciones colectadas, el gradiente de elución con NaCl, la actividad proteasa y la actividad ribonucleasa (RNasa) de las fracciones. Cromatograma representativo de 4 repeticiones en iguales condiciones sobre columna con carboximetil celulosa de 11 cm de longitud y 1,5 cm de diámetro, equilibrada en acetato de sodio 50 mM pH 5,0 con un flujo de 0,8 mL/min y elución con gradiente lineal de NaCl hasta 1 M. Se aplicaron muestras de 6 a 7 mg de proteína y se colectaron fracciones de 1,6 mL.

inicialmente las RNasas, seguidas por las proteasas, por lo que algunas fracciones intermedias contenían ambas proteínas, eluyendo posteriormente fracciones que contenían proteasas altamente purificadas, en las cuales se descartó completamente la actividad RNasa. La proteína con actividad RNasa eluyó en las fracciones 27 a 38 entre 0,42 y 0,51 M NaCl, con mayor actividad en las fracciones 30 a 36 (eluidas entre 0,45 y 0,5 M NaCl) en las cuales se hidrolizó casi la totalidad del sustrato. La actividad proteasa eluyó en las fracciones 30 a 48, entre 0,45 y 0,64 M NaCl, con máxima actividad en las fracciones 44 a 47 (eluidas entre 0,56 y 0,59 M NaCl).

Esto indica que las fracciones 27 a 29 contenían enzimas RNasas purificadas, las fracciones 30 a 38 contenían al menos dos enzimas con actividades proteasa y RNasa, y, finalmente, las fracciones 39 a 48 contenían enzimas proteasas purificadas y separadas de las RNasas. La separación individual de una enzima por lo general se logra aplicando técnicas cromatográficas en secuencia, no obstante, en el presente trabajo se logró obtener algunas fracciones purificadas y algunas fracciones conteniendo ambas enzimas.

Otros autores, al fraccionar las proteínas del látex de *C. procerca* utilizando cromatografía de intercambio catiónico en una columna de flujo rápido de CM-sefarosa equilibrada con acetato de sodio 50 mM pH 5 y eluída con 0,2 y 0,3 M de NaCl reportaron la recuperación de 3 fracciones de proteínas distintas. Una de ellas con masa molecular cercana a los 97 kDa que, aunque no lograron identificar el grupo al cual pertenece, los autores descartaron que se tratase de una cisteína proteasa, no solo por su masa molecular, sino también por ser la única que no tuvo actividad proteolítica sobre gelatina al 0,1 % ni sobre el sustrato BANA específico para este

grupo de proteasas. Otras dos proteínas identificadas en dos fracciones diferentes presentaron masas moleculares cercanas a los 30 kDa (Soares *et al.*, 2007) y actividad sobre los sustratos mencionados.

A partir del látex de plantas de *C. procera* creciendo en la India, Dubey y Jagannadham (2003), reportaron la presencia de 6 proteínas que fueron eluidas en un procedimiento en el cual, después de remover la fracción poliisoprenoide, el látex crudo fue sujeto a fraccionamiento con 50 % de sulfato de amonio, el sobrenadante dializado aplicado sobre una columna de intercambio catiónico utilizando CM-sefarosa y las proteínas unidas fueron eluidas con un gradiente lineal de 0 a 0,8 M de NaCl, recuperándose dos picos con actividad proteolítica, semejantes en cuanto a pH y temperatura óptimos, conteniendo una proteína y 5 proteínas, respectivamente. Estos autores lograron purificar una proteasa llamada proceraina, con una masa molecular estimada de 28,79 kDa, con alta actividad sobre caseína, azocaseína, azoalbúmina y hemoglobina, la cual fue activada por activadores de grupos tioles, como el β -mercaptoetanol, e inhibida por inhibidores correspondientes, como el ácido iodoacético, lo que indicó que pertenece al grupo de las cisteína proteasas.

En general, la separación y el aislamiento de las proteínas del látex puede variar dependiendo de la técnica, de la resina empleada en el caso de las cromatografías y del volumen de las fracciones recuperadas. Estudios más detallados acerca del contenido de proteínas del látex de *C. procera* realizados por electroforesis bidimensional y espectrometría de masa indicaron que las proteínas solubles son

predominantemente básicas (PI > 6,0) y con masa molecular entre 5 y 95 kDa, con componentes mayoritarios de 26 kDa (Freitas *et al.*, 2007).

Pedilanthus tithymaloides

En la figura 15 se observa la separación cromatográfica del ECL de *P. tithymaloides* bajo las condiciones descritas, alcanzadas luego de los procedimientos de estandarización, que permitió la separación de dos grupos de fracciones con actividades proteasas y RNasas, eluyendo las primeras en las fracciones 2 a 5 con 0,2 M de NaCl y las segundas en las fracciones 23 a 40 entre 0,28 y 0,4 M de NaCl, con marcada mayor actividad en las fracciones 23 a 27 (eluidas con 0,3 M de NaCl).

La tendencia, en el caso del ECL de *C. procera*, de eluir, en fracciones muy cercanas entre si, dos proteínas con actividades enzimáticas proteasa y RNasa, motivó a determinar ambas actividades en todas las fracciones colectadas de los procedimientos de separación cromatográfica con el ECL de *P. tithymaloides*, a los fines de garantizar la no contaminación de las fracciones de proteasas. No obstante, en esta especie, ambas enzimas laticíferas eluyeron en fracciones distantes entre si. Esto indica que, bajo las condiciones utilizadas en estas separaciones cromatográficas, ambas enzimas presentan diferentes cargas, ya que la elución en una resina de intercambio catiónico obedece a la fuerza iónica con la cual las moléculas en separación interactúan con el intercambiador de iones (Voet *et al.*, 2006).

Un reporte previo acerca de la presencia de proteasas en el látex de *P. tithymaloides* indica la purificación de una proteína, denominada pedilanthina, por un procedimiento de separación que incluía precipitación con sulfato de amonio al 80 %

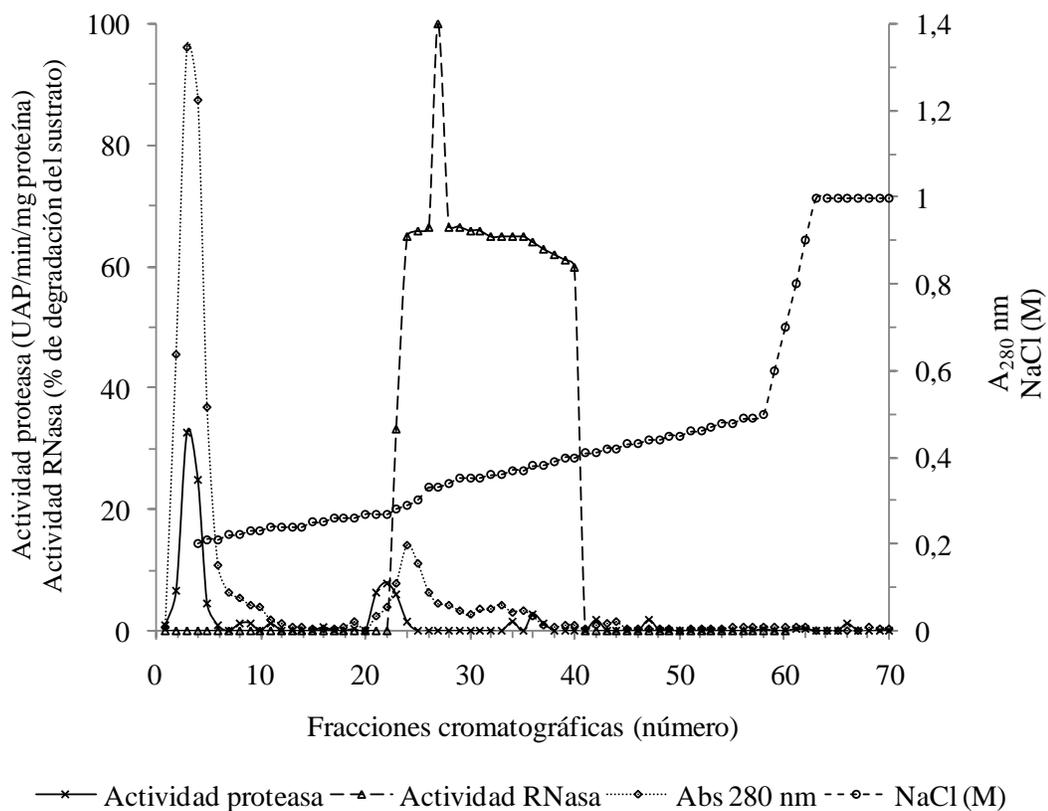


Figura 15. Separación cromatográfica del extracto crudo de látex de *Pedilanthus tithymaloides*. Se indica la $A_{280\text{ nm}}$ de las fracciones colectadas, el gradiente de elución de NaCl, la actividad proteasa y la actividad ribonucleasa (RNasa) de las fracciones. Cromatograma representativo de 2 repeticiones en iguales condiciones, sobre una columna con carboximetil celulosa de 11 cm de longitud y 1,5 cm de diámetro, equilibrada en acetato de sodio 50 mM pH 5,0 con un flujo de 0,8 mL/min y elución con gradiente lineal de NaCl hasta 1 M. Se aplicaron muestras de 6 a 7 mg de proteína y se colectaron fracciones de 1,6 mL.

de saturación, seguido de diálisis y cromatografía de intercambio catiónica, con elución en un rango entre 0,15 y 0,2 M de NaCl (Bhowmick *et al.*, 2008).

Un resumen comparativo de las características de los ECL de ambas especies, de actividad proteasa laticífera y las condiciones óptimas de separación cromatográfica se presenta en el cuadro 6.

Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

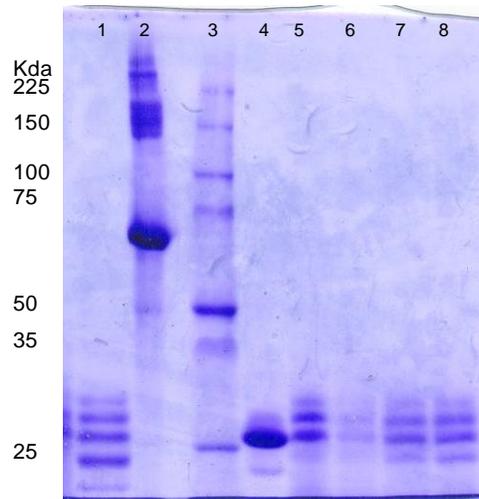
Calotropis procera

La separación electroforética del ECL de *C. procera*, reveló la presencia de al menos 5 proteínas con masas moleculares entre 20 y 30 kDa (figura 16 A, carril 1), de las cuales se logró separar y aislar, por medio de los procedimientos cromatográficos, dos proteínas con actividades diferentes y masas moleculares semejantes entre sí y muy cercanas a la banda de la Con A utilizada como patrón (figura 16 B). De estas dos proteínas, una de ellas, de masa molecular ligeramente superior, tiene actividad RNasa, y la segunda presentó actividad proteasa (figura 16 B). El alto grado de pureza se puede constatar en la figura 16 B, carriles 9 y 16, en los cuales se observa una única banda correspondiente, respectivamente, a las enzimas RNasa y proteasa purificadas. En las fracciones cromatográficas separadas por SDS-PAGE con tinción con nitrato de plata, se evidenció la presencia de al menos 10 proteínas (carriles 3, 4 y 7 de la figura 16 B), lo que indica que al menos 5 de ellas están presentes en el ECL a muy bajas concentraciones por lo que no son detectadas por la tinción con azul de Comassie. De estas 10 proteínas, se espera que la actividad proteasa sea propia de al menos 5 de ellas, de acuerdo a Freitas *et al.* (2007). Los resultados concuerdan con lo reportado por otros autores (Dubey y Jagannadham, 2003; Freitas *et al.*, 2007),

Cuadro 6. Características de los ECL de *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides* y condiciones óptimas de separación cromatográfica.

	<u><i>C. procera</i></u>	<u><i>P. tithymaloides</i></u>
pH óptimo de extracción proteica	5 y 7	5
Proteína laticífera (mg/mL)	40,5 ± 8,2	60,8 ± 14
Actividad proteasa del ECL (UAP/min)		
➤ Ovoalbúmina	18,65	No hidroliza
➤ Caseína	8,9	4,6
➤ Azocaseína	11,74	4,5
➤ ASB	12,45	No hidroliza
➤ pH óptimo	5	8,5
➤ Temperatura óptima (°C)	70	70
Separación cromatográfica del ECL		
	<u>min</u> <u>NaCl(M)</u>	<u>min</u> <u>NaCl(M)</u>
➤ Gradiente de elución	7 0,22 95 0,6 100 1	7 0,2 120 0,5 130 1
➤ Fracciones con actividad Proteasa	30 a 48	2 a 5
➤ Concentración de NaCL (M) a la cual eluyen las proteasas	0,45 a 0,64	0,2
➤ Fracciones con actividad RNasa	27 a 38	23 a 40
➤ Concentración de NaCL (M) a la cual eluyen las RNasas	0,42 a 0,5	0,28 a 0,40

A



B

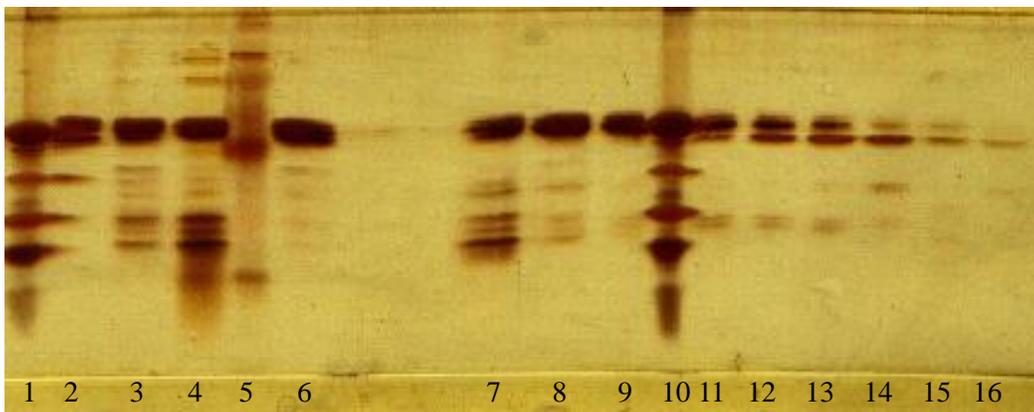


Figura 16. Análisis electroforético del extracto crudo de látex (ECL) y fracciones cromatográficas de *Calotropis procera*. (A). SDS-PAGE al 10%. Carriles: 1) ECL; 2) ASB Sigma®; 3) Marcador de masa molecular (V849A Promega®); 4) Con A (Amersham®); 5 a 8) ECL provenientes de distintas preparaciones. (B). SDS-PAGE al 15 %. Carriles: 1 y 10) Con A Amersham®; 5) Marcador de masa molecular. Los demás carriles contienen fracciones cromatográficas. 2,3,4,6,7,8,9) Fracciones con actividad RNasa (fracciones cromatográficas 29 a 35); 11, 12 y 13) Fracciones con actividad RNasa y proteasa (fracciones cromatográficas 36 a 38); 14, 15 y 16) Fracciones con actividad proteasa (fracciones cromatográficas 39 a 41).

quienes identificaron enzimas con actividad proteasa en el látex de *C. procera* con masa molecular entre 26 y 28,8 kDa y reportan la existencia de al menos 9 proteínas en el látex de esta planta, identificadas en geles de electroforesis teñidos con azul de Comassie.

Pedilanthus tithymaloides

La separación electroforética del ECL de *P. tithymaloides* reveló la presencia de al menos 11 polipéptidos con masas moleculares entre 11 y 70 kDa aproximadamente, con una banda particularmente abundante alrededor de 26 kDa (figura 17 A). Esta banda, cercana a los 26 kDa constituye la proteína más abundante en el látex de esta especie y, de acuerdo a los resultados obtenidos de los análisis de actividad de las fracciones cromatográficas, no tiene actividad proteasa ni RNasa, y corresponde al máximo pico de Abs cuantificado dentro de las primeras 10 fracciones colectadas (figura 15). Se presume sea de importancia debido a su alta proporción en comparación con los demás polipeptidos observados, pudiendo tratarse de alguna proteína con función protectora para la planta como ha sido reportado en otras especies (Vierstra, 1996). Esta banda fue observada en geles publicados previamente por otros autores (Bhowmick *et al.*, 2008) sin que hasta la fecha haya sido caracterizada o denominada.

Las dos fracciones separadas con actividad RNasa y proteasa se ubican en un rango muy cercano a los 28 kDa, siendo la RNasa de tamaño ligeramente inferior (figura 17 B). El alto grado de pureza de ambas proteínas se puede constatar en la figura 17 B, carriles 2 y 3, en los cuales se observa una única banda en cada carril, correspondiente a las enzimas RNasa y proteasa, respectivamente.

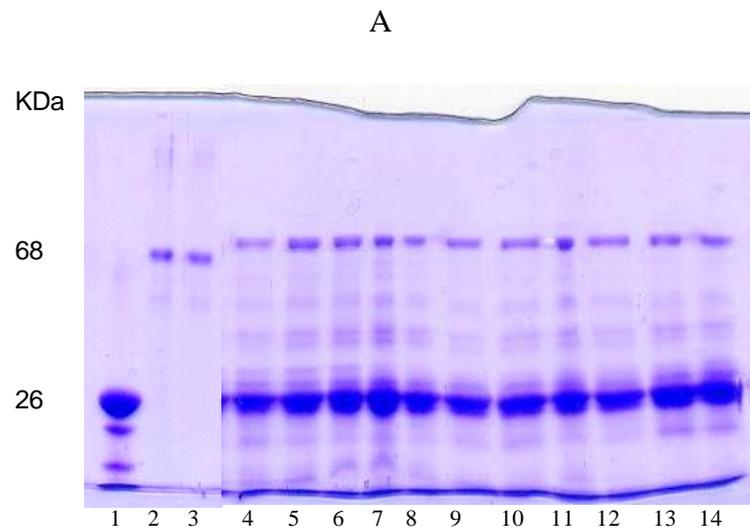


Figura 17. Análisis electroforético del extracto crudo de látex (ECL) y fracciones cromatográficas de *Pedilanthus tithymaloides*. (A). SDS-PAGE al 10%. Carriles: 1) Con A (Amersham®); 2 y 3) ASB Sigma®; 4 a 14) ECL proveniente de distintas preparaciones. (B). SDS-PAGE al 15 %. Carriles: 1) ECL; 2) Fracción con actividad RNasa; 3) Fracción con actividad proteasa.

Cercana a los 66 kDa se destaca una banda que, de acuerdo a lo reportado en la literatura, se corresponde con la proteasa pedilanthina (Bhowmick *et al.*, 2008).

Otros autores han reportado la presencia de al menos 7 proteínas separadas por SDS-PAGE en el látex de *P. tithymaloides*, con masas moleculares aproximadas ubicadas entre 12 y 63 kDa (Bhowmick *et al.*, 2008), valores estos muy cercanos a los encontrados en el presente trabajo, e inclusive se puede inferir que las diferencias se encuentran ubicadas dentro de los rangos de variación considerados aceptados y que suelen ocurrir entre distintos laboratorios de investigación cuando se emplean técnicas de mediana resolución.

Al comparar el patrón de proteínas encontradas en el látex de *C. procera* contra el observado en los geles de electroforesis del látex de *P. tithymaloides*, resaltan diferencias en cuanto a la cantidad de polipeptidos y la abundancia relativa entre ellos. El látex de *C. procera*, contiene menor cantidad de proteínas y todas ellas se presentan en proporciones semejantes entre si. Por el contrario, el látex de *P. tithymaloides* contiene mayor número de proteínas y destaca una de mayor abundancia, alrededor de 26 kDa.

Determinación de la masa molecular

De acuerdo al análisis electroforético de las proteínas presentes en los látices de las plantas en estudio, confrontando la movilidad relativa de cada banda, de masa molecular conocida, con la ubicación de las proteínas que presentaron actividad proteasa y RNasa en las fracciones cromatográficas, se estimó una masa molecular, para ambas enzimas del látex de *C. procera*, de 28 y 30 kDa, respectivamente (figura 18). Este resultado concuerda la masa molecular de la proceraína, de 28,8 kDa, una

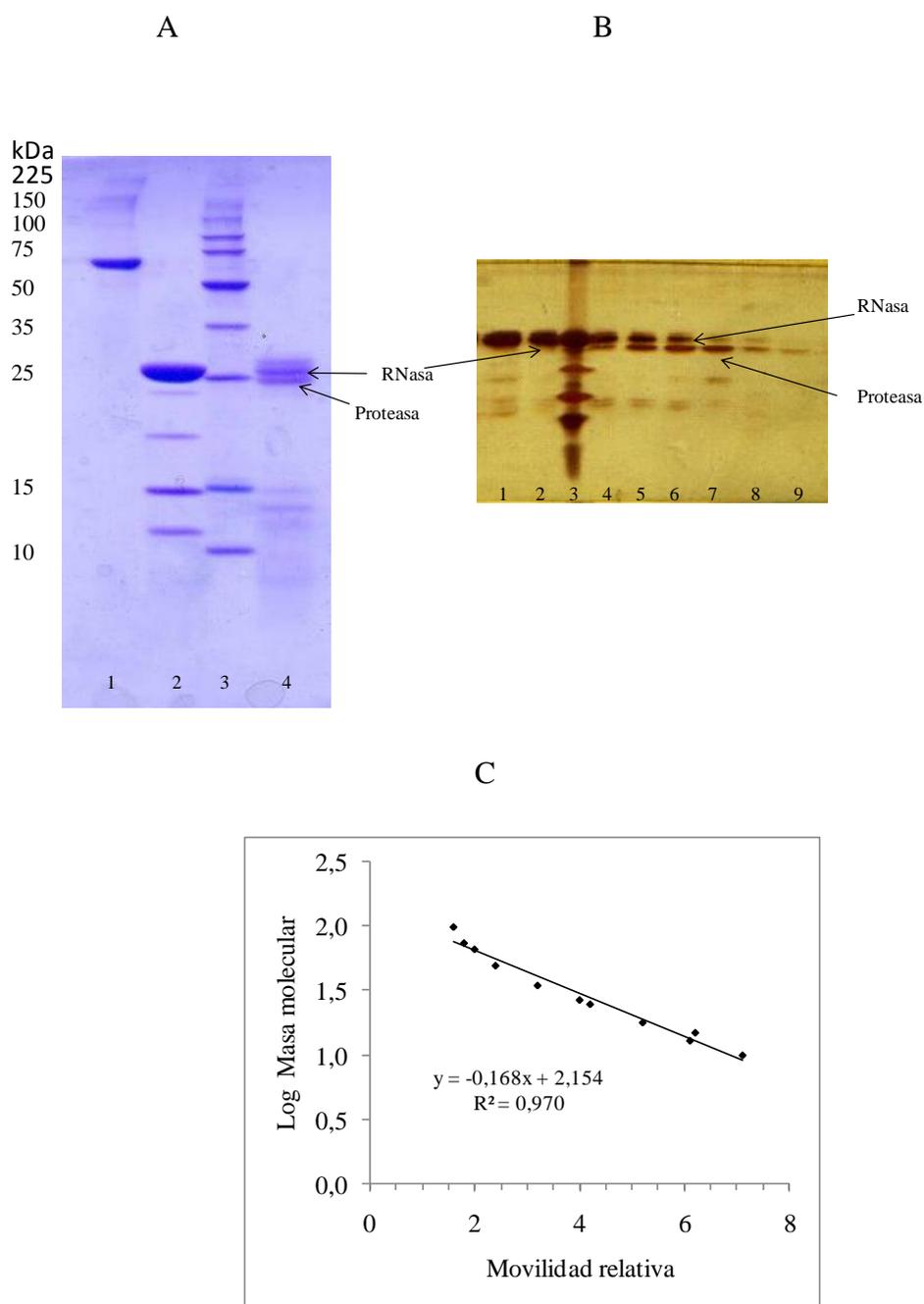


Figura 18. Análisis electroforético del extracto crudo de látex (ECL) de *Calotropis procera*. (A). SDS-PAGE al 15%. Carriles: 1) ASB Sigma®; 2) Con A (Amersham®); 3) Marcador de PM (Promega®); 4) ECL. (B). SDS-PAGE al 15%. Carriles: 3) Con A (Amersham®); 1), 2), 4) a 9) Fracciones cromatográficas. (C). Gráfica y ecuación para la estimación de la masa molecular de las enzimas aisladas y purificadas.

cisteína proteasa reportada por Dubey y Jagannadham (2003), presente en el látex de *C. procera*. Similarmente, la masa molecular de las proteínas con actividad proteasa y RNasa de *P. tithymaloides* está alrededor de 28 a 30 kDa (figura 19). Estos valores se ubican en el rango comúnmente reportado para otras proteasas y RNasas de diversas especies. Por lo general, ambas son enzimas de tamaño relativamente pequeño. Una revisión de los valores de masa molecular de proteasas de látex reportados en la literatura indican que para la mayoría de las enzimas del tipo serina proteasas, el rango se ubica entre 50 y 80 kDa (Lynn y Clevette-Radford, 1984; 1985; Yadav *et al.*, 2006; Pande *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2007; Sing *et al.*, 2008; Tomar *et al.*, 2008), mientras que para la mayoría de las enzimas del tipo cisteína proteasas se ubica en un rango entre 23 y 29 kDa (Sugiura y Sazaki, 1973; Sengupta *et al.*, 1984; Nallamsetty *et al.*, 2003; Kundu *et al.*, 2000; Takhurta *et al.*, 2004; Morcelle *et al.*, 2004; Dubey y Jagannadham, 2003), lo que indica que las proteasas de ambas especies, aisladas en el presente estudio, podrían considerarse pertenecer a la clase cisteína proteasa, a juzgar por su masa molecular, comparable a la de la mayoría de las enzimas de este grupo que han sido reportadas en la literatura (Sugiura y Sazaki, 1973; Nallamsetty *et al.*, 2003; Dubey y Jagannadham, 2003; Freitas *et al.*, 2007); no obstante, los rangos de pH y temperatura óptimos de ambos ECL son más parecidos a los de la serina proteasas. Se requieren realizar mayores estudios al respecto.

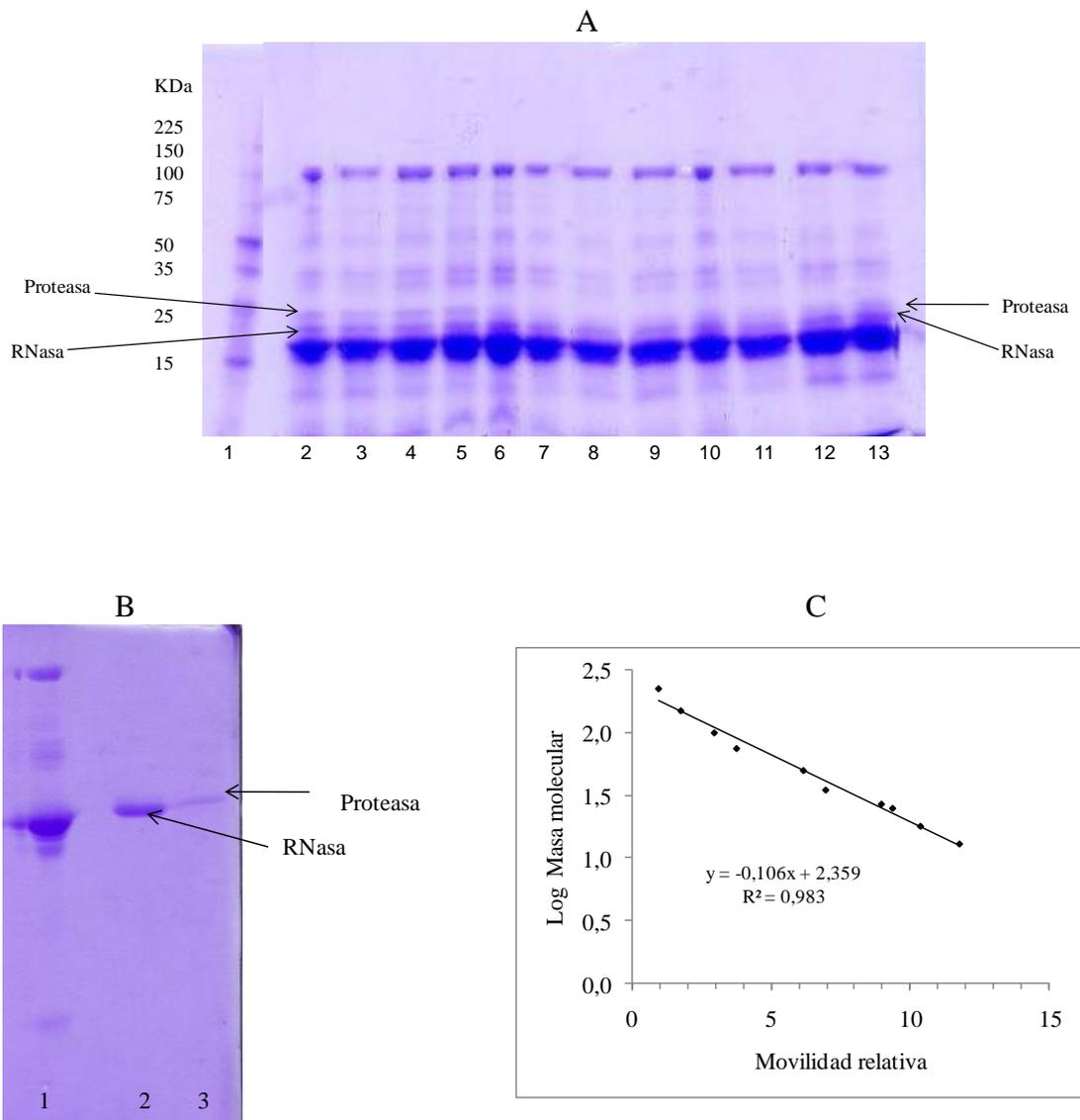


Figura 19. Análisis electroforético del extracto crudo de látex (ECL) de *Pedilanthus tithymaloides*. (A). SDS-PAGE al 10%. Carriles: 1) Marcador de PM (Promega®); 2 al 13) ECL provenientes de distintas preparaciones. (B). SDS-PAGE al 15%. Carriles: 1) ECL; 2) Fracción cromatográfica con actividad RNasa; 3) Fracción cromatográfica con actividad proteasa. (C). Gráfica y ecuación para la estimación de la masa molecular.

En relación con las enzimas RNasas, la presente en el látex de *Chelidonium majus*, la única RNasa laticífera hasta ahora reportada, tiene una masa molecular de 20 kDa (Nawrot *et al.*, 2008). En otras RNasas vegetales, como la RNasa bifuncional de *Solanum lycopersicum* se han reportado valores en el rango de 31 a 35 kDa (Dohnálek *et al.*, 2010) y, en especies animales se han reportado RNasas de entre 10 y 28 kDa (Ardelt *et al.*, 1991; 2007; 2009). Este constituye el primer reporte acerca de la presencia de enzimas RNasas en el látex de *C. procera* y *P. tithymaloides*.

Prueba de glicosilación

No se observó indicios de proteínas glicosiladas en el ECL o en alguna de las fracciones cromatográficas de *C. procera* (figura 20 A), semejante a lo reportado por Dubey y Jagannadham (2003). Por el contrario, en el ECL y fracciones cromatográficas de *P. tithymaloides* es evidente la presencia de tres bandas glicosiladas (figura 20 B, carriles 8 y 10). De acuerdo a los análisis de actividad, una de las proteínas glicosiladas se corresponde con la RNasa encontrada en el extracto crudo de éste látex (figura 20 C, carril 10). La fracción con actividad proteasa no es glicosilada. La banda de 26 kDa, la proteína más abundante presente en el ECL de *P. tithymaloides*, es, evidentemente, una proteína glicosilada (figura 20 B, carril 8). Así mismo, en el ECL de *P. tithymaloides* se observa una banda glicosilada alrededor de los 14 kDa (figura 20 B, carril 8), que no ha sido reportada en la literatura.

Algunas proteasas de látex son proteínas glicosiladas, como calotropina FI y FII (ambas cisteína proteasas) aisladas del látex de *C. gigantea* (Abraham y Joshi, 1979), no obstante, otras son no glicosiladas como la procerafina (cisteína proteasa) aislada del látex de *C. procera* (Dubey y Jagannadham, 2003), y la pedilanthina,

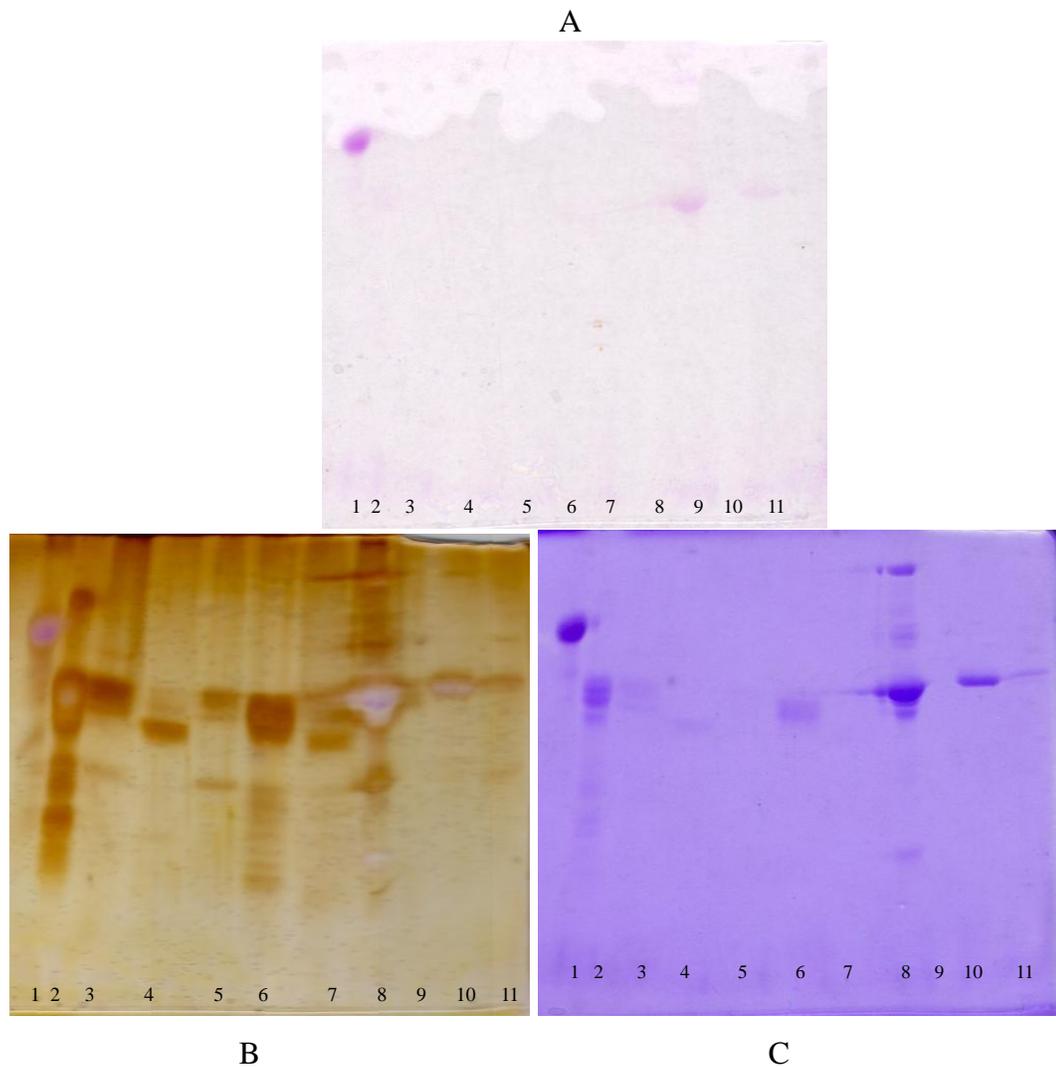


Figura 20. Prueba de glicosilación de proteínas. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida al 15% de extracto crudo de látex (ECL) y fracciones cromatográficas de *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides* teñidos con (A) Kit para detectar proteínas glicosiladas. (B) Nitrato de plata. (C) Azul Coomasie. En todos los casos los carriles se corresponden a: 1) Control positivo con peroxidasa, 2) ECL de *C. procera*, 3) a 7) fracciones cromatográficas de *C. procera* con actividades RNasa (carriles 3, 5 y 6) o Proteasa (carriles 4 y 7), 8) ECL de *P. tithymaloides*, 9) a 11) fracciones cromatográficas de *P. tithymaloides* con actividad RNasa (carril 10) o Proteasa (carril 11).

aislada del látex de *P. tithymaloides* (Bhowmick *et al.*, 2008). Así mismo, dentro del grupo de las enzimas RNasas se ha reportado tanto ausencia como presencia de diversos patrones de glicosilación. Son glicosiladas la nucleasa bifuncional de *Solanum lycopersicum* (Dohnálek *et al.*, 2010), algunas RNasas que pertenecen a la familia T2, como la presente en *Aspergillus oryzae* (Luhtala y Parker, 2010), las enzimas Onconasa y Amphinasa, ambas extraídas de los oocitos de *Rana pipiens* (Ardelt *et al.*, 2009). Por el contrario, son no glicosiladas la RNasa de los estilos de *Pyrus pyrifolia* (Norioka *et al.*, 2007), la RNasa T2 de *Rhizopus niveus* y *Momordica charantia* (Irie, 1999). El patrón de glicosilación de estas enzimas es variable y está asociado a su función biológica, su estabilidad, resistencia a la proteólisis y a la desnaturalización, a la participación en procesos de reconocimiento e interacción intercelular (McKee y McKee, 2003) y puede variar inclusive dentro de proteínas que pertenecen a una misma familia (Irie, 1999).

Un resumen comparativo de las características bioquímicas de las proteínas encontradas en los látices de ambas especies en estudio se presenta en el cuadro 7. *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides*, pertenecientes a dos familias diferentes (Asclepiadaceae y Euphorbiaceae, respectivamente), contienen patrones disímiles en cuanto a número de proteínas, abundancia relativa entre ellas, masas moleculares y presencia de proteínas glicosiladas. Mayores estudios se requieren a los fines de profundizar en cuanto a las características bioquímicas de las proteínas laticíferas, como contribución para el conocimiento de moléculas biológicas con potencial uso biotecnológico en diversas áreas de la ciencia y la investigación.

Cuadro 7. Características bioquímicas de las proteínas de *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides*.

	<u><i>C. procera</i></u>	<u><i>P. tithymaloides</i></u>
Bandas polipeptídicas en el ECL		
➤ Tinción con azul de toluidina	5	11
➤ Tinción con nitrato de plata	10	11
Rango de masa molecular de las bandas (kDa)	20 a 30	11 a 70
Presencia de bandas predominantes	No	1
Masa molecular de la proteasa purificada (kDa)	± 28	± 30
Masa molecular de la RNasa purificada (kDa)	± 30	± 28
Proteínas glicosiladas	Ninguna	Tres
Masa molecular de proteínas glicosiladas (kDa)	-	±14 y 26 a 28
Posible identificación de la proteasa purificada	Proceraína	No reportada
Posible identificación de la RNasa purificada	No reportada	No reportada
Posible identificación de la banda predominante	-	No reportada

Identificación de la fracción terpénica

Los extractos metanólicos laticíferos, conteniendo la fracción terpenoide de las plantas en estudio, presentaron una concentración de 4 % y de 1,78 % (p/v) en *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides*, respectivamente. En la figura 21 se presenta una imagen representativa de los resultados de la identificación cualitativa de las fracciones terpenoides. Los colores verde y ámbar oscuro indican la presencia de triterpenos, tal como lo señalan algunos autores (Mu *et al.*, 2010). En algunos casos, las muestras fueron aplicadas a mayor concentración, observándose un incremento en la tonalidad del color (figura 22), corroborando la presencia de fracciones conteniendo terpenos.

Citotoxicidad de los extractos de látex y proteasas

a.- Viabilidad y proliferación celular

Calotropis procera

La viabilidad de las células Jurkat, determinada en presencia del ECL de *C. procera* y expresada como porcentaje del control correspondiente, disminuyó significativamente, con respecto al control a todas las dosis evaluadas, a las 24 y 48 horas ($p < 0,05$) (figura 23), en forma no dependiente de la dosis, con porcentajes de inhibición del crecimiento celular entre 29 y 39 % con respecto al control a las 24 horas y entre 24 y 44 % a las 48 horas.

Al evaluar el efecto del ECL de *C. procera* sobre la proliferación de las células Jurkat, se encontró que el Índice de Proliferación (IP) disminuyó significativamente después de 24 y 48 horas de incubación en todos los tratamientos

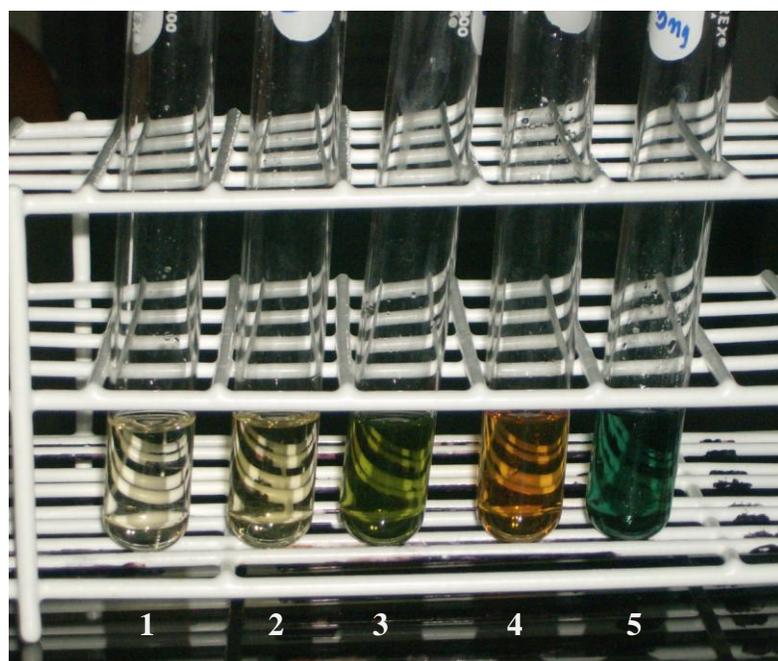


Figura 21. Comparación cualitativa colorimétrica de las fracciones terpenoides en los extractos metanólicos laticíferos de *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides*. 1) Control negativo sin terpenos. 2) Fracción terpenoide de *C. procera* a una concentración de 3 mg/mL. 3) Fracción terpenoide de *C. procera* a 15 mg/mL. 4) Fracción terpenoide de *P. tithymaloides* a una concentración de 3 mg/mL. 5) Control positivo con 3 mg/mL de colesterol.

Las muestras secas se disolvieron en 1 mL de una solución de cloroformo: metanol (2:1), tomándose 0,4 mL al que se agregó 1 mL de ácido *p*-tolueno sulfónico preparado al 13 % en cloroformo: metanol (2:1). Se añadió 3 mL de anhídrido acético, se agitó la mezcla, se disminuyó la temperatura del tubo de reacción a 4° C y se añadió 0,4 mL de ácido sulfúrico concentrado mantenido a 4° C, procediéndose a mezclar nuevamente y dejar en reposo a temperatura ambiente durante 20 min para que se desarrolle el color.

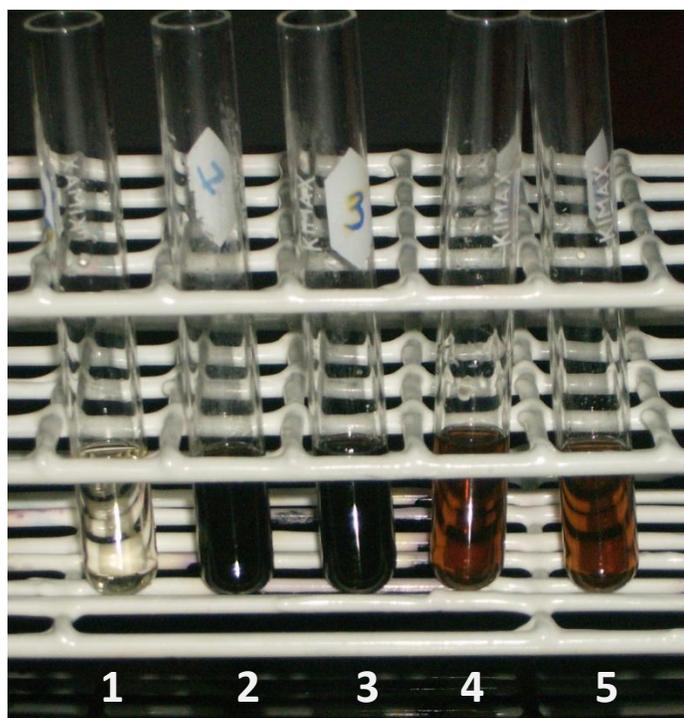


Figura 22. Identificación de las fracciones terpenoides en extractos metanólicos laticíferos de *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides*. 1) Control negativo sin terpenos. 2) y 3) Duplicados de fracción terpenoide de *C. procera* a una concentración de 30 mg/mL 4) y 5) Duplicados de fracción terpenoide de *P. tithymaloides* a una concentración de 6 mg/mL.

Las muestras secas se disolvieron en 0,5 mL de una solución de cloroformo: metanol (2:1), tomándose 0,4 mL al que se agregó 1 mL de ácido *p*-tolueno sulfónico preparado al 13 % en cloroformo: metanol (2:1). Se añadió 3 mL de anhídrido acético, se agitó la mezcla, se disminuyó la temperatura del tubo de reacción a 4° C y se añadió 0,4 mL de ácido sulfúrico concentrado mantenido a 4° C, procediéndose a mezclar nuevamente y dejar en reposo a temperatura ambiente durante 20 min.

Calotropis procera

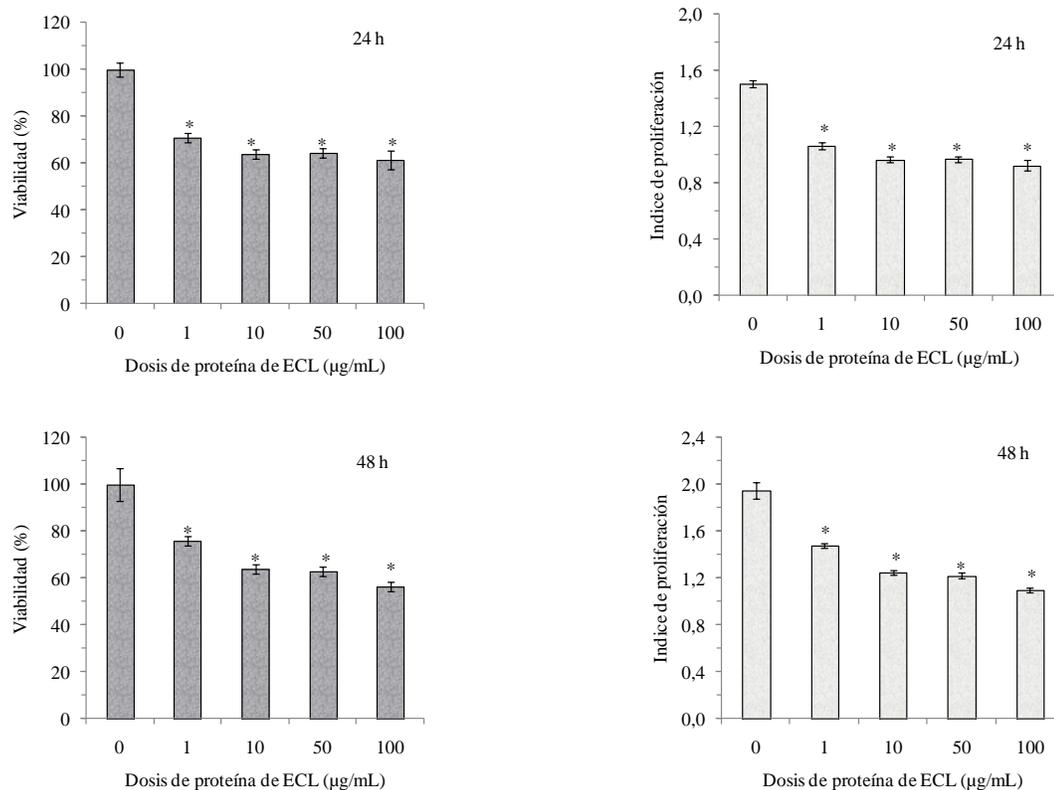


Figura 23. Efecto del extracto crudo de látex (ECL) de *Calotropis procera* sobre la viabilidad y la proliferación de células Jurkat. Las células (250×10^3 cel/mL) fueron tratadas con las concentraciones indicadas de ECL. Los datos se obtuvieron después de 24 y 48 h, mediante el método del MTT. En los controles el ECL fue sustituido por acetato de sodio 50 mM pH 5. Los resultados se expresan como promedios \pm DE de 8 experimentos independientes, por triplicado. (*) Indica diferencias con respecto al control ($p < 0,05$) por Análisis de varianza (ANAVAR) seguida de prueba de Dunnett.

con respecto al control ($p < 0,05$), y, al igual que en la viabilidad, el efecto sobre el IP resultó ser independiente de la dosis.

Estos resultados son indicativos de la disminución de la actividad metabólica de las células durante las primeras 48 horas, con respecto al inicio del cultivo, como consecuencia del efecto citotóxico del ECL de *C. procera* sobre las células Jurkat. El efecto independiente de la dosis podría ser consecuencia de la interacción de los diversos componentes presentes en el ECL, o inclusive de haberse alcanzado el efecto máximo con las dosis empleadas, o bien por tratarse de una sustancia citotóxica específica de una fase determinada en el ciclo celular por lo cual, aunque se aumenten las dosis empleadas, solo una proporción de células son sensibles a los efectos tóxicos (Velasco *et al.*, 1993). El efecto citostático, evidenciado en la disminución significativa del IP, en todas las dosis evaluadas, indica un efecto interesante, considerando que, precisamente, las células cancerosas se caracterizan por la disminución o ausencia del control del crecimiento y proliferan intensivamente. Una sustancia con efectos inhibitorios sobre la proliferación de células cancerosas tiene un alto potencial para ser utilizada como agente quimioterapéutico. En este caso se requieren mayores estudios.

No obstante observarse un efecto del ECL de *C. procera* sobre la viabilidad y la proliferación de las células Jurkat después de 24 y 48 h de incubación, las fracciones cromatográficas purificadas, conteniendo las enzimas con actividad proteasa, no provocaron un efecto citotóxico estadísticamente significativo. Tomando en consideración que la fracción proteasa aislada se corresponde muy probablemente con una cisteína proteasa, a juzgar por sus características bioquímicas, estos

resultados concuerdan con lo reportado por Soares *et al.* (2007), quienes evaluaron tres fracciones con actividad proteolítica separadas del látex de *C. procera* utilizando cromatografía de intercambio iónico en una columna de flujo rápido de CM-sefarosa equilibrada con acetato de sodio 50 mM pH 5 y eluída con 0,2 y 0,3 M de NaCl. De estas fracciones, solo una, con masa molecular cercana a los 97 kDa, exhibió actividad citotóxica sobre diversas líneas celulares cancerígenas. Estos autores descartaron que las cisteína proteasas, abundantemente encontradas en el látex de esta planta, tengan participación en la citotoxicidad exhibida por el látex de *C. procera* sobre células SF295 (cáncer de cerebro) y MDA-MB-435 (cáncer de seno), no obstante, el efecto podría ser variable en diversas líneas celulares. En el presente estudio, tampoco se observó efecto citotóxico sobre células Jurkat (leucemia linfocítica).

Pedilanthus tithymaloides

Al evaluar el ECL de *P. tithymaloides* sobre la viabilidad celular, se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) a las 24 y 48 horas con las dosis más altas empleadas (50 y 100 $\mu\text{g/mL}$), con tendencia a disminuir la viabilidad tanto a las 24 como a las 48 horas, a partir de la dosis más baja utilizada (1 $\mu\text{g/mL}$), observándose un efecto dosis-dependiente, contrario a lo encontrado con el ECL de *C. procera*. Resultados semejantes fueron obtenidos en el IP de las células en presencia de las diferentes concentraciones de ECL de *P. tithymaloides* observándose, para ambas variables, un marcado efecto dependiente de la dosis (figura 24) en el cual el efecto aumenta gradualmente al aumentarse la dosis empleada. La inhibición del crecimiento celular fue de 19, 40 y 44 %, al aplicar dosis de 10, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$,

Pedilanthus tithymaloides

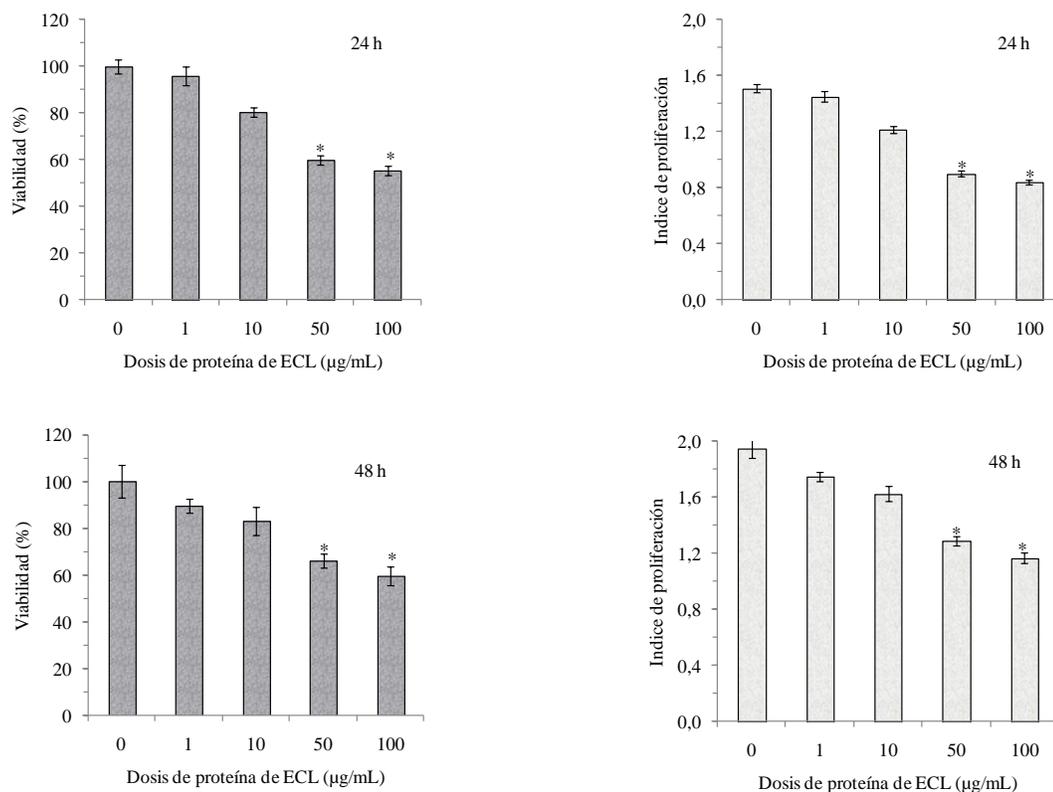


Figura 24. Efecto del extracto crudo de látex (ECL) de *Pedilanthus tithymaloides* sobre la viabilidad y la proliferación de células Jurkat. Las células (250×10^3 cel/mL) fueron tratadas con las concentraciones indicadas de ECL. Los datos se obtuvieron después de 24 y 48 h, mediante el método del MTT. En los controles el ECL fue sustituido por acetato de sodio 50 mM pH 5. Los resultados se expresan como promedios \pm DE de 8 experimentos independientes, por triplicado. (*) Indica diferencias con respecto al control ($p < 0,05$) por Análisis de varianza (ANAVAR) seguida de prueba de Dunnett.

respectivamente, después de 24 horas de incubación. A las 48 horas, el crecimiento celular fue inhibido en proporciones semejantes (17, 34 y 40 % con dosis de 10, 50 y 100 µg/mL, respectivamente). No obstante, al evaluar las fracciones provenientes de las separaciones cromatográficas de *P. tithymaloides* conteniendo enzimas con actividad proteasa, no se encontró efecto citotóxico, por lo que se puede sugerir que el efecto citotóxico observado en el ECL podría ser consecuencia de la combinación de diversas sustancias presentes en el extracto crudo, o bien atribuible a otros componentes de naturaleza soluble que podrían estar presentes en el ECL y se eliminaron durante el fraccionamiento cromatográfico, o inclusive no podría descartarse la participación de alguna otra proteína presente en el ECL.

En este sentido, tanto en el caso de *C. procera* como de *P. tithymaloides*, puede sugerirse la participación de las RNasas, debido a los antecedentes reportados en la literatura, ya que diversas enzimas RNasas han sido evaluadas como modalidades potenciales en terapias anticáncer (Ardelt *et al.*, 2009). Su potencial citotóxico está fundamentado en su capacidad para degradar ARN y en consecuencia inhibir la biosíntesis de proteína en los estados de transcripción y traducción. Los agentes anticáncer utilizados en las quimioterapias tradicionales generalmente tienen como diana el ADN o ciertas proteínas con propiedades de receptores o transducción de señales, no obstante, el ARN puede constituir un blanco efectivo para ciertas drogas potenciales como las ribonucleasas (Porta *et al.*, 2008). De las enzimas RNasas evaluadas en su acción anticancerosa, una de ellas ha alcanzado a la fecha ensayos clínicos, la enzima Ranpirnasa, denominada comercialmente Onconasa®, extraída de oocitos y embriones de *Rana pipiens*, una proteína homóloga a la RSB,

que, aunque menos eficiente catalíticamente, es más citotóxica que la mayoría de sus homólogas RNAsas. Sus características y efectos citotóxicos y anticáncer han sido extensivamente revisados (Rutkoski y Raines, 2008; Ardelt *et al.*, 2009). Otra evidencia se obtuvo a partir del látex de *Chelidonium majus*, una planta de la familia Papaveraceae ampliamente distribuída en Europa y el oeste de Asia, de la cual se ha logrado aislar dos nucleasas de 20 y 36 kDa con actividad RNasa y DNasa, respectivamente, las cuales provocaron inducción de la apoptosis, dependiente de la concentración, en células HeLa originadas de cáncer cervical humano y transformadas con virus de papiloma humano oncogénico tipo 18 (HPV18) (Nawrot *et al.*, 2008).

Al comparar ambas especies estudiadas en el presente trabajo, los resultados indican que el ECL de *C. procera* presenta mayor efecto citotóxico y citostático al provocar disminución de la viabilidad celular y del IP con dosis de 1 µg/mL, observándose el efecto del ECL de *P. tithymaloides* a partir de 50 µg/mL, tanto a las 24 como a las 48 horas de incubación.

b.- Necrosis y apoptosis celular

La exposición de las células Jurkat a concentraciones crecientes de proteínas laticíferas de ECL de *C. procera* durante 24 horas y analizadas por la técnica de exclusión del azul tripano no mostró efectos significativos sobre la necrosis celular (figura 25). Por el contrario, el efecto dependiente de la dosis del ECL de *Pedilanthus tithymaloides* fue entre 4 y 6 veces más marcado en comparación con *C. procera*. Aún con la dosis más alta de ECL de *C. procera* (200 µg/mL), no se observó necrosis

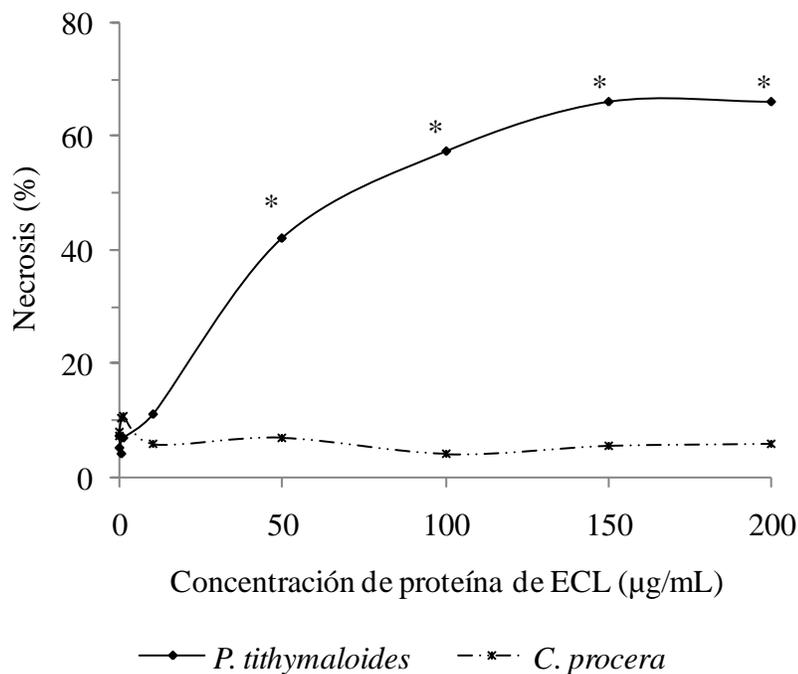
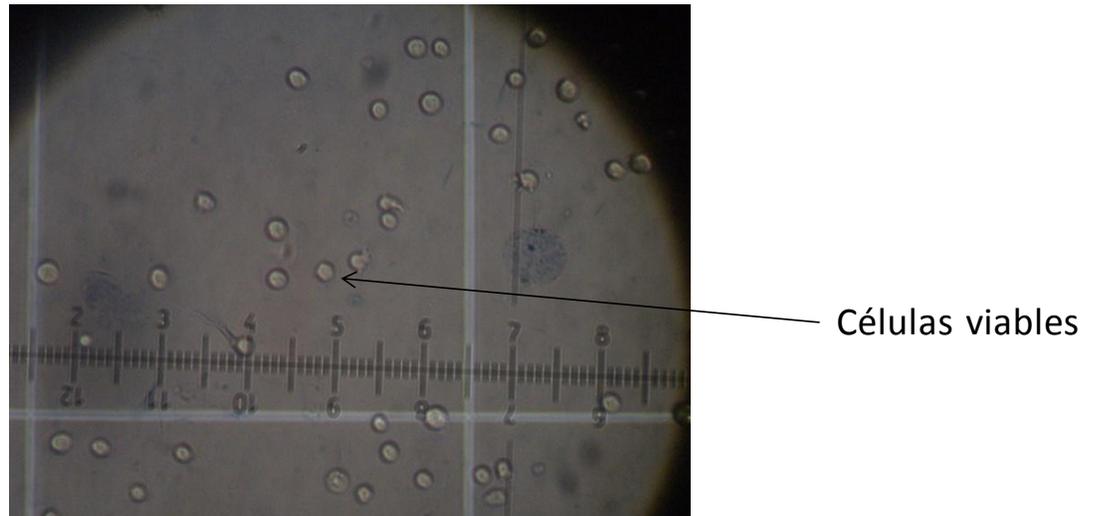


Figura 25. Citotoxicidad del extracto crudo de látex (ECL) de *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides* sobre células Jurkat. Las células (10^6 células/mL) fueron tratadas con las concentraciones indicadas de ECL. Los datos se obtuvieron después de 24 h. Se utilizó la técnica de exclusión del azul tripano. En los controles el ECL fue sustituido por acetato de sodio 50 mM pH 5. Los resultados se expresan como promedios de 8 experimentos independientes. (*) Diferencias con respecto al control ($p < 0,05$) por Análisis de varianza (ANAVAR) seguida de prueba de Dunnett.

celular en la misma magnitud a la observada en presencia del ECL de *P. tithymalooides* (figura 26). No obstante, cuando se estudió la citotoxicidad del ECL de *C. procera* utilizando la técnica de microscopía de fluorescencia con tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio, una técnica más sensible a la del azul tripano (Hathaway *et al.*, 1964), si se observó toxicidad, independiente de la dosis empleada (Figura 27 A), con poco o ningún efecto sobre la apoptosis y aumentando la necrosis celular ($p < 0,05$) con respecto al control. La muerte celular puede ocurrir por necrosis o por apoptosis. La necrosis es un fenómeno pasivo en el cual la sustancia tóxica que la desencadena altera las estructuras o las funciones celulares, produciendo vesículas, hinchazón y estallido celular, cuyo contenido afecta a las células vecinas induciendo una respuesta inflamatoria. Por el contrario, la apoptosis es un proceso activo que supone la activación de determinados genes cuya expresión da lugar a la síntesis de varias proteínas que pueden actuar bien como reguladores de la transcripción, frenando la proliferación celular, o bien como activadores de enzimas proteolíticas y nucleasas que alteran o fragmentan proteínas y ADN, y se considera un mecanismo programado de respuesta biológica cuando la célula percibe un conflicto entre las señales que percibe, procedentes del interior o del exterior (Repetto, 1997). El efecto de una sustancia potencialmente tóxica para las células cancerígenas es de mayor valor cuando induce la muerte celular a través de un mecanismo principal de apoptosis para evitar los fenómenos de inflamación característicos de la necrosis.

Los resultados indican que el ECL de *C. procera* provocó muerte celular por necrosis, contrario a lo reportado por Soares *et al.* (2007), quienes evaluaron la

A) *Calotropis procera*



A) *Pedilanthus tithymaloides*

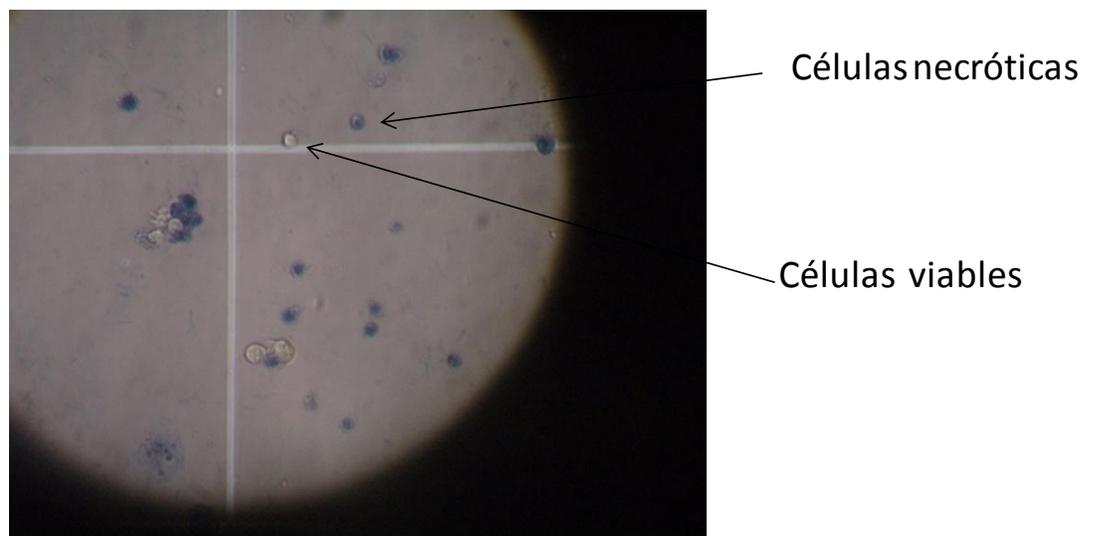
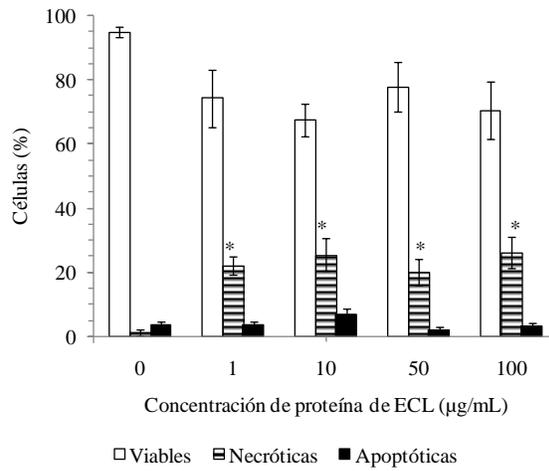


Figura 26. Microfotografías de células Jurkat tratadas con extracto crudo de látex (ECL). (A) *Calotropis procera*. (B) *Pedilanthus tithymaloides*. Las células (10^6 células/mL) fueron tratadas con $200 \mu\text{g/mL}$ de ECL. Las imágenes fueron obtenidas después de 24 h con la técnica de exclusión del azul tripano y son representativas de un total de 8 repeticiones con un aumento de 20X. En los controles el ECL fue sustituido por acetato de sodio 50 mM pH 5.

A) *Calotropis procera*



B) *Pedilanthus tithymaloides*

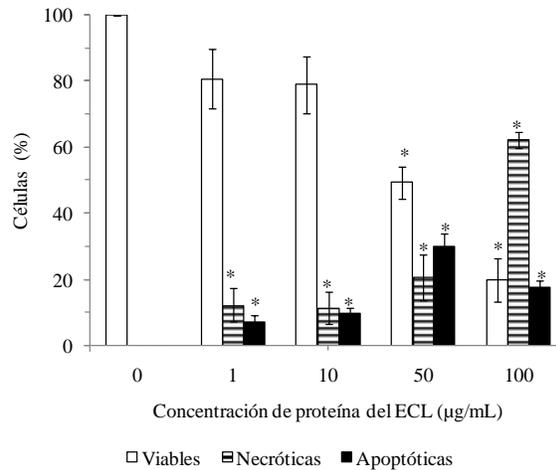


Figura 27. Efecto citotóxico del extracto crudo de látex (ECL) en células Jurkat. (A) *Calotropis procera*. (B) *Pedilanthus tithymaloides*. Las células (10^6 células/mL) fueron tratadas con las concentraciones indicadas de ECL. Los datos se obtuvieron después de 24 h. Se utilizó la técnica de microscopía de fluorescencia con naranja de acridina/bromuro de etidio. En los controles el ECL fue sustituido por acetato de sodio 50 mM pH 5. Los resultados se expresan como promedios \pm DE de 8 experimentos independientes. (*) Diferencias con respecto al control ($p < 0,05$) por Análisis de varianza (ANAVAR) seguida de prueba de Dunnett.

citotoxicidad de un extracto de proteínas laticíferas de *C. procera* sobre líneas celulares HL-60 (leucemia promielocítica humana) encontrando un incremento en el número de células apoptóticas utilizando la técnica de microscopía de fluorescencia con tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio (NA/BE).

Los estudios con ECL de *P. tithymaloides* sobre las células Jurkat utilizando la técnica de microscopía de fluorescencia (figura 27 B) indicaron disminución de la viabilidad y aumento de la necrosis y apoptosis celular con diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control y un efecto más marcado y dosis dependiente, tanto en la necrosis como en la apoptosis, obteniéndose un efecto interesante con la dosis de 50 $\mu\text{g/mL}$, con la cual el porcentaje de células apoptóticas fue de 30 %, lo que representa 9 % más alto en comparación con las células necróticas.

Citotoxicidad de las fracciones terpenoides

Al evaluar el efecto citotóxico del extracto metanólico de látex (EML) que contiene la fracción terpenoide de *C. procera* se encontró que la viabilidad disminuyó significativamente ($p < 0,05$) a las 24 y 48 horas, con todas las dosis probadas, de forma independiente de la dosis (figura 28), con respecto al control. A las 48 horas se produjo una inhibición de 15 % con la dosis de 1 $\mu\text{g/mL}$. Asimismo, provocó inhibición de la proliferación celular con todas las dosis utilizadas y estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0,05$). Al igual que con el ECL, el EML de *C. procera* presentó efectos independientes de las dosis utilizadas, lo que puede ser consecuencia de haberse alcanzado el máximo efecto posible con la dosis de 1 $\mu\text{g/mL}$.

Calotropis procera

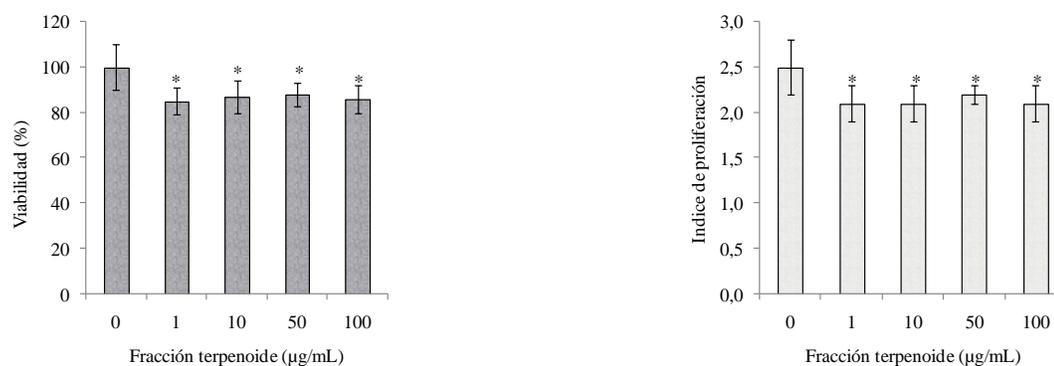


Figura 28. Efecto del extracto metanólico de látex (EML) de *Calotropis procera* sobre la viabilidad y la proliferación de células Jurkat. Las células (250×10^3 cel/mL) fueron tratadas con las concentraciones indicadas de EML. Los datos se obtuvieron después de 48 h, mediante el método del MTT. En los controles el EML fue sustituido por DMSO a una concentración final de 0,5 %. Los resultados se expresan como promedios \pm DE de 8 experimentos independientes, por triplicado.

(*) Diferencias con respecto al control ($p < 0,05$) por Análisis de varianza (ANAVAR) seguida de prueba de Dunnett.

El EML que contiene la fracción terpenoide de *P. tithymaloides* provocó una disminución significativa ($p < 0,05$) sobre la viabilidad con todas las dosis evaluadas a las 24 y 48 horas de incubación, de forma no dependiente de la dosis (figura 29), sin efectos significativos sobre la proliferación de las células.

El efecto inhibitorio del EML de ambas especies sobre las células Jurkat estuvo ubicado entre 12 y 18 % por lo cual no se consideró realizar estudios de necrosis y apoptosis celular, debido al relativamente bajo potencial citotóxico en comparación con los ECL, los cuales provocaron porcentajes de inhibición celular entre 10 y 44 %, comparando en ambos casos los resultados obtenidos después de 48 h de incubación.

Pedilanthus tithymaloides

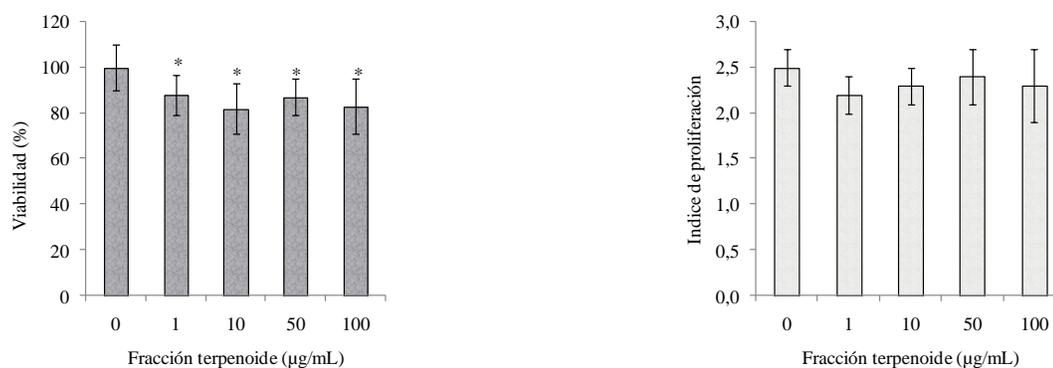


Figura 29. Efecto del extracto metanólico de látex (EML) de *Pedilanthus tithymaloides* sobre la viabilidad y la proliferación de células Jurkat. Las células (250×10^3 cel/mL) fueron tratadas con las concentraciones indicadas de EML. Los datos se obtuvieron después de 48 h, mediante el método del MTT. En los controles el EML fue sustituido por DMSO a una concentración final de 0,5 %. Los resultados se expresan como promedios \pm DE de 8 experimentos independientes, por triplicado.

(*) Diferencias con respecto al control ($p < 0,05$) por Análisis de varianza (ANAVAR) seguida de prueba de Dunnett.

VI.- CONCLUSIONES

1. El látex de *Calotropis procera* contiene en promedio $40,5 \pm 8,2$ mg de proteína/mL, alrededor de 1,5 veces menos que el látex de *Pedilanthus tithymaloides*, que contiene en promedio $60,8 \pm 14$ mg/mL.
2. El látex de *C. procera* presentó actividad proteolítica sobre azocaseína, ovoalbúmina, ASB y caseína. La actividad sobre ovoalbúmina fue mayor a pH 5 y 70°C. El látex de *P. tithymaloides* no presentó actividad sobre ASB ni ovoalbúmina pero sí hidrolizó la caseína y la azocaseína. La actividad proteasa del ECL de *P. tithymaloides* sobre azocaseína fue óptima a pH 8,5 y 70 °C.
3. Utilizando cromatografía de intercambio iónico se logró separar fracciones con actividad proteasa y fracciones con actividad RNasa en el látex de ambas especies en estudio. La elución de las RNasas y de las proteasas del látex de *C. procera* fue máxima con 0,45 a 0,5 M de NaCl y 0,56 a 0,59 M de NaCl, respectivamente. En el látex de *P. tithymaloides* la elución de las RNasas y proteasas fue a 0,3 y 0,2 M de NaCl, respectivamente.
4. La separación electroforética de proteínas del látex de *C. procera* permitió la observación de 5 proteínas con pesos moleculares entre 28 y 30 kDa. En geles teñidos con nitrato de plata se observaron 10 polipéptidos. En el látex de *P. tithymaloides* se observaron 9 proteínas con pesos moleculares entre 11 y 70 kDa.
5. En ambas especies, las proteínas con actividad proteasa y RNasa presentaron valores de masa molecular entre 28 y 30 kDa, ninguna de las cuales resultó ser glicosilada en el látex de *C. procera*. La proteína con actividad RNasa presente en el látex de *P. tithymaloides* es glicosilada.

6. Los extractos metanólicos laticíferos presentaron una concentración de fracción terpenoide de 4 % y de 1,78 % (p/v) en *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides*, respectivamente.
7. Los efectos citotóxicos del ECL y del EML de *C. procera* resultaron ser independientes de las dosis evaluadas, con efectos inhibitorios sobre la viabilidad y la proliferación celular en las 24 y 48 horas de incubación a partir de 1 µg/mL. Las fracciones purificadas de proteasas no provocaron efectos citotóxicos sobre las células estudiadas.
8. El ECL de *P. tithymaloides* presentó un efecto citotóxico dependiente de la dosis sobre las células Jurkat. Con la dosis de 50 µg/mL fue mayor la apoptosis en comparación con la necrosis. El EML provocó efectos citotóxicos independientes de las dosis empleadas. Las fracciones purificadas de proteasas no provocaron efectos citotóxicos sobre las células estudiadas.

VII.- RECOMENDACIONES

1. Continuar con los estudios de caracterización bioquímica de las enzimas identificadas en el látex de estas plantas.
2. Realizar experimentos para evaluar sustratos específicos para cisteína, serina o aspartil proteasas y en presencia de inhibidores específicos a los fines de realizar una caracterización bioquímica más detallada de las proteasas presentes en los látices de las plantas en estudio.
3. Realizar estudios de citotoxicidad de los ECL y EML sobre otras líneas celulares cancerígenas y determinar los valores de IC₅₀ correspondientes.
4. Evaluar el efecto citotóxico y citostático de las enzimas RNasas presentes en los látices de *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides*.
5. Aislar, purificar y caracterizar la proteína glicosilada de 26 kDa contenida en el látex de *Pedilanthus tithymaloides*, de mayor abundancia relativa, y, de acuerdo a lo encontrado en el presente trabajo, su purificación puede lograrse con dos pasos de cromatografía que incluye una cromatografía de intercambio catiónico seguida de una cromatografía de afinidad con un intercambiador unido a la Concanavalina A, una lectina que une de forma específica los glúcidos incluyendo los que normalmente se encuentran en las glicoproteínas.

VIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, K. y Joshi, P. 1979. Studies on proteinases from *Calotropis gigantea* látex. Purification and some properties of two proteinases containing carbohydrates. *Biochimica et Biophysica Acta* 568:111-119.
- Abreu, P., Matthew, S., González, T., Costa, D., Segundo, M. y Fernandes, E. 2006. Anti-inflammatory and antioxidant activity of a medicinal tincture from *Pedilanthus tithymaloides*. *Life Sciences* 78 (14):1578-1585.
- Alencar, N.M., Figueredo, I., Vale, M., Bitencurt, F., Oliveira, J., Ribeiro, R. y Ramos, M. 2004. Anti-inflammatory effect of the látex from *Calotropis procera* in three different experimental models: peritonitis, paw edema and hemorrhagic cystitis. *Planta Medicinal* 70:1144-1149.
- Al-Qarawi, A., Mahmoud, O., Sobaih, H. y Adam, S. 2001. A preliminary study on the antihelmintic activity of *Calotropis procera* látex against *Haemonchus contortus* infection in Najdi sheep. *Veterinary Research Communications* 25: 61-70.
- An, Z.W., Xie, L., Cheng, H., Zhou, Y., Zhang, Q., He, X.G. y Huang, H.S. 2009. A silver staining procedure for nucleic acids in polyacrylamide gels without fixation and pretreatment. *Analytical Biochemistry* 391(1):77-79.
- Ankush, R.D., Nagda, K.K., Suryakar, A.N., y Ankush, N.R. 2003. Tuberculosis altering erythrocyte membrane topology—a lectin haemagglutination study. *Indian Journal of Tuberculosis* 50:95–98.

- Ardelt, W., Ardelt, B. y Darzynkiewicz, Z. 2009. Ribonucleases as potential modalities in anticancer therapy. *European Journal of Pharmacology* 625: 181-189.
- Ardelt, B., Ardelt, W., Pozarowski, P., Kunicki, J., Shogen, K. y Darzynkiewicz, Z. 2007. Cytostatic and cytotoxic properties of Amphinase: a novel cytotoxic ribonuclease from *Rana pipiens* oocytes. *Cell Cycle* 15(6):3097-3102.
- Ardelt, W., Mikulski, S.M. y Shogen, K. 1991. Amino acid sequence of an anti-tumor protein from *Rana pipiens* oocytes and early embryos. Homology to pancreatic ribonucleases. *Journal of Biological Chemistry* 266:245-251.
- Arends, S. y Schön, A. 1997. Partial purification and characterization of nuclear ribonuclease P from wheat. *European Journal of Biochemistry* 244: 635-645.
- Arima, K., Uchikoba, T., Yonezawa, H., Shimada, M. y Kaneda, M. 2000. Cucumisin-like protease from the látex of *Euphorbia supina*. *Phytochemistry* 53:639-644.
- Azarkán, M., El Moussaoui, A., Wuytswinkel, D., Dehon, G. y Looze, Y. 2003. Fractionation and purification of the enzymes stored in the látex of *Carica papaya*. *Journal of Chromatography B*. 790:229-238.
- Azcon-Bieto, J. y Talon, M. 1993. Fisiología y bioquímica vegetal. Interamericana McGraw-Hill. España. 580 p.
- Bhowmick, R., Prasanna, N., Jagannadham, M. y Kayastha, A. 2008. Purification and characterization of a novel protease from the látex of *Pedilanthus tithymaloids*. *Protein & Peptide Letters* 15(9):1009-1016.

- Bishayee, A., Ahmed, S., Brankov, N. y Perloff, M. 2011. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library* 16:980-996.
- Brady, C.J. 1985. Fruit ripening. *Annual Review of Plant Physiology* 38: 155-178.
- Chang, C.I., Chang, J.Y., Kuo, C., Pan, W., y Kuo, Y. 2005. Four new 6-nor5(6-7)abeo-abietane type diterpenes and antitumoral cytotoxic diterpene constituents from the bark of *Taiwania cryptomerioides*. *Planta Medicinal* 71 (1):72-76.
- Choedon, T., Mathan, G., Arya, S., Kumar, V.L. y Kumar, V. 2006. Anticancer and cytotoxic properties of the látex of *Calotropis procera* in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 12(16):2517-2522.
- De, S., Bag, A. y Mukherji, S. 1997. Potencial use of *Pedilanthus tithymaloides* Poit. as a renewable resource of plant hydrocarbons. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 38:105-108.
- De Freitas, C., Lopes, J., Beltramini, L., De Oliveira, R., Oliveira, J. y Ramos, M. 2011. Osmotin from *Calotropis procera* latex: new insights into structure and antifungal properties. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808(10):2501-2507.
- Demir, Y., Alayli, A., Yildirim, S. y Demir, N. 2005. Identification of protease from *Euphorbia amygdaloides* látex and its use in cheese production. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 35(4):291-9.
- De Pascual, T., Urones, J.G., Marcos, I.S., Basabe, P., Sexmero, M. y Fernández, R. 1987. Triterpenes from *Euphorbia broteri*. *Phytochemistry* 26:1767-1776.

- Devaraj, K.B., Gowda, L.R. y Prakash, V. 2008. An unusual thermostable aspartic protease from the látex of *Ficus racemosa* (L.). *Phytochemistry* 69(3):647-655.
- Dewan, S., Sangraula, H. y Kumar, V. 2000. Preliminary studies on the analgesic activity of látex of *Calotropis procera*. *Journal of Ethnopharmacology* 73: 307-311.
- Dhar, S.N., Ray, S.M., Roy, A. y Dutta, S.K. 1988. Oral anti-inflammatory activity of pedilanthain—a new proteolytic enzyme from *Pedilanthus tithymaloides*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 50:281–283.
- Dohnálek, J., Koval, T., Lipovová, P., Podzimek, T. y Matousek, J. 2010. Structure analysis of group I plants nucleases. *Journal of Synchrotron Radiation*. 18:29-30.
- Domsalla, A. y Melzig, M. 2008. Occurrence and properties of proteases in plant lattices. Review. *Planta Medica* 74(7):699-711.
- D'Souza, R., Varun, M., Masih, J. y Paul, M. 2010. Identification of *Calotropis procera* L. as a potential phytoaccumulator of heavy metals from contaminated soils in Urban North Central India. *Journal of Hazardous Materials* 184(1-3):457-464.
- Dubey, V.K. y Jagannadham, M.V. 2003. Procerain, a stable cysteine protease from the látex of *Calotropis procera*. *Phytochemistry* 62(7):1057-1071.
- Dutta, S.K. y Dhar, S.N.A. 1984. A new proteolytic enzyme from *Pedilanthus tithymaloides*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 46:223–224.

- FAO, 2011. Statistical yearbook 2010. Disponible en <http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/ess-yearbook2010/yearbook2010-production/es/>
- Fisher, H., Machen, T., Widdicombe, J., Carlson, T., King, S., Chow, J. e Illek, B. 2004. A novel extract SB-300 from the stem bark látex of *Croton lechleri* inhibits CFTR-mediated chloride secretion in human colonic epithelial cells. *Journal of Ethnopharmacology* 93:351-357.
- Freitas, C., Soares, J., Miranda, M., Macedo, N., Pereira, M., Villas-Boas, L. y Viana, M. 2007. Enzymatic activities and protein profile of látex from *Calotropis procera*. *Plant Physiology and Biochemistry* 45(10-11):781-789.
- Giordani, R., Moulin, A. y Verger, R. 1991. Tributyroilglycerol hydrolase activity in *Carica papaya* and other latices. *Phytochemistry* 30:1069-1072.
- Gonzalez, F. 1991. Nomenclatura de Química Orgánica. Universidad de Murcia. Secretariado de Publicaciones. España. 683 p.
- Good, N.E. e Izawa, S. 1972. Hydrogen ion buffers. *Methods of Enzymology (Part B)* 24:53-68.
- Gurib-Fakim, A. 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27:1-93.
- Hagel, J., Yeung, E. y Facchini, P. 2008. Got milk?. The secret life of laticifers. Review. *Trends in Plant Science* 13(12):631-639.
- Hames, D. 1996. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In *Gel Electrophoresis of Proteins. A practical approach* (B. Hames y D. Rickwood Edts). Oxford University Press. USA. 383 p.

- Haki, G. y Rakshit, S. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology* 89:17-34.
- Hathaway, W., Newby, L. y Githens, J. 1964. The acridine orange viability test applied to bone marrow cells. i. correlation with trypan blue and eosin dye exclusion and tissue culture transformation. *Blood* 23:517-525.
- International Rubber Study Group (IRSG). 2012. Quarterly statistics. Disponible en <http://www.rubberstudy.com>
- Irie, M. 1999. Structure-function relationships of acid ribonucleases: lysosomal, vacuolar and periplasmic enzymes. *Pharmacology & therapeutics* 81(2):77-89.
- Kalita, D. y Saikia, C. 2004. Chemical constituents and energy content of some látex bearing plants. *Bioresource Technology* 92:219-227.
- Kamalakannan, S., Madhiyazhagan, P., Dhandapani, A., Murugan, K. y Barnard, D. 2010. *Pedilanthus tithymaloides* (Euphorbiaceae) leaf extract phytochemicals: toxicity to the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Vector Borne Zoonotic Disease*. 10(8):817-820.
- Kareem, S., Akpan, I. y Osho, M. 2003. *Calotropis procera* (Sodom apple) a potential material for enzyme purification. Short communication. *Bioresource Technology* 87:133-135.
- Kembhavi, A. Buttle, D., Knight, C. y Barret, A. 1993. The two cysteine endopeptidases of legume seeds: purification and characterization by use of specific fluorometric assay. *Archives of Biochemistry and Biophysical* 303: 208-213.

- Kenny, A. 1952. The determination of cholesterol by the Liebermann-Burchard reaction. *The Biochemical Journal* 52(4):611-619.
- Kim, E., Suh, K., Kim, D., Jung, E., Seo, C., Son, J., Woo, M. y McLaughlin, J. 2005. Asimitrin and 4-hydroxytrilobin, new bioactive annonaceous acetogenins from the seed of *Asimina triloba* possessing a bis-tetrahydrofuran ring. *Journal of Natural Products* 68(2):194-197.
- Kumar, S., Dewan, S., Sangraula, H. y Kumar, V. 2001. Anti-diarrhoeal activity of the látex of *Calotropis procera*. *Journal of Ethnopharmacology* 76:115-118.
- Kumar, V. y Basu, N. 1994. Anti-inflammatory activity of the látex of *Calotropis procera*. *Journal of Ethnopharmacology* 44:123-125.
- Kummalue, T. 2005. Molecular mechanism of herbs in human lung cancer cells. *Journal of Medical Association of Thailand* 88(11):1725-1734.
- Kundu, S., Sundd, M. y Jagannadham, M.V. 2000. Purification and characterization of a stable cysteine protease ervatamin B, with two disulfide bridges, from the látex of *Ervatamia coronaria*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(2):171-179.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-687.
- Larhsini, M., Oumoulid, L., Lazrek, H., Wataleb, S., Bousaid, M., Bekkouche, M., Markouk, M. y Jana, M. 1999. Screening of antibacterial and anti parasitic activity of six Moroccan medicinal plants. *Therapie* 54:763-765.

- Leighton, T.J., Dor, R.H., Warren, R.A. y Kelly, R.A. 1973. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology* 76(1):103-122.
- Lima-Filho, J., Patriota, J., Silva, A., Filho, N., Oliveira, R., Alencar, N. y Ramos, M. 2010. Proteins from latex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Ethnopharmacology* 129(3):327-334.
- Lima, R., Silva, M., Aguiar, C., Chaves, E., Dias, K., Macêdo, D., de Sousa, F., Carvalho, K., Ramos, M. y Vasconcelos, S. 2012. Anticonvulsant action of *Calotropis procera* latex proteins. *Epilepsy & Behavior* (en imprenta).
- Lopes, M.I., Saffi, J., Echeverrigaray, S., Pêgas, J. y Salvador, M. 2004. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. *Journal of Ethnopharmacology* 95:437-445.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193(1):265-275.
- Luhtala, N. y Parker, R. 2010. T2 family ribonucleases: ancient enzymes with diverse roles. *Trends in Biochemistry Sciences* 35(5): 253-259.
- Lynn, K.R. y Clevette-Radford, N.A. 1983. Isolation and characterization of euphorbain 1, a proteinase from the látex of *Euphorbia lathyris*. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 746:154-159.
- Lynn, K.R. y Clevette-Radford, N.A. 1984. Euphorbain p, a serine protease from *Euphorbia pulcherrima*. *Phytochemistry* 23:682-683.

- Lynn, K.R. y Clevette-Radford, N.A. 1985a. Three serine proteases from the látex of *Euphorbia cyparissias*. *Phytochemistry* 24:925-928.
- Lynn, K.R. y Clevette-Radford, N.A. 1985b. Two proteases from the látex of *Elaeophorbia drupifera*. *Phytochemistry* 24:2843-2845.
- Lynn, K.R. y Clevette-Radford, N.A. 1986a. Lectins from latices of *Euphorbia* and *Elaeophorbia* species. *Phytochemistry* 25:1553-1557.
- Lynn, K.R. y Clevette-Radford, N.A. 1986b. Ficin E, a serine-centred protease from *Ficus elastica*. *Phytochemistry* 25:1559-1561.
- Lynn, K.R. y Clevette-Radford, N.A. 1986c. Hevains: Serine-centred proteases from the látex of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* 25:2279-2282.
- Lynn, K.R. y Clevette-Radford, N.A. 1987a. Acid phosphatases from latices of euphorbiaceae. *Phytochemistry* 26:655-657.
- Lynn, K.R. y Clevette-Radford, N.A. 1987b. Biochemical properties of latices from the Euphorbiaceae. *Phytochemistry* 26:939-944.
- Lynn, K.R. y Clevette-Radford, N.A. 1988. Proteases of Euphorbiaceae. *Phytochemistry* 27:45-50.
- Mahmoud, O.M., Haroun, E., Sobaih, M., Omer, O. y Adam, S. 2001. Comparative efficacy of *Calotropis procera* látex and sulfadimidine against experimentally-induced *Eimeria ovinoidales* infection in Najdi lambs. *Small Ruminants Research* 42:135-140.
- Malthouse, J. y Brocklehurst, K. 1976. Preparation of fully active Ficin from *Ficus glabrata* by covalent chromatography and characterization of its active centre

- by using 2,2'-dipyridyl disulphide as a reactivity probe. The Biochemical Journal 159: 221-234.
- Marcano, D. y Hasegawa, M. 2002. Fitoquímica orgánica. 2ª Ed. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas. 588 p.
- Markouk, M., Bekkouche, K., Larhsini, M., Bousaid, M., Lazrek, H. y Jana, M. 2000. Evaluation of some Moroccan medicinal plants extracts for larvicidal activity. Journal of Ethnopharmacology 73(1-2):293-297.
- Mascolo, N., Sharma, R., Jain, S.C. y Calpasso, F. 1988. Ethnopharmacology of *Calotropis procera* flowers. Journal of Ethnopharmacology 22(2):211-221.
- Matousek, J., Soucek, J., Slavík, T., Tománek, M., Lee, J.E. y Raines, R.T. 2003. Comprehensive comparison of the cytotoxic activities of onconase and bovine seminal ribonuclease. Comparative biochemistry and physiology. C, Toxicology & Pharmacology 136(4):343-356.
- Matsuda, H., Nakashima, S., Abdel-Halim, O., Morikawa, T. y Yoshikawa, M. 2010. Cucurbitane-type triterpenes with anti-proliferative effects on U937 cells from an egyptian natural medicine, *Bryonia cretica*: Structures of new triterpene glycosides, Bryoniaosides A and B. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 58(5):747-751.
- McKee, T. y McKee, J. 2003. Bioquímica. La base molecular de la vida. 3ª Ed. McGraw-Hill Interamericana. España. 773 p.
- Menon, M., Vithayathil, P., Raju, S. y Ramadoss, C. 2002. Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the látex of *Synadenium grantii* Hook, "P". Plant Science 163:131-139.

- Middleton, E., Kandaswami, C. y Theoharides, T.C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Reviews* 52:673-751.
- Mohamed, S., Saka, S., El-Sharkawy, S.H., Ali, A.M. y Muid, S., 1996. Antimycotic screening of 58 Malaysian plants against plant pathogens. *Pesticide Science* 47:259–264.
- Morcelle, S., Caffini, N. y Priolo, N. 2004. Proteolytic properties of *Funastrum clausum* látex. *Fitoterapia* 75:480-493.
- Moreno, R., Ferreira, M., De Souza, P. y Capparelli, L. 2005. Technological properties of látex and natural rubber of *Hevea brasiliensis* clones. *Ciencia Agrícola* 62(2):122-126.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 16:55-63.
- Mousry, L.E. 1997. Insecticidal activity of *Calotropis procera* extract on the Flesfly, *Sarcophaga haemorrhoidalis* fallen. *Journal of Egyptian Society of Parasitology* 2:505-514.
- Mu, L.H., Gong, Q.Q., Zhao, H.X. y Liu, P. 2010. Triterpenoid saponins from *Ardisia gigantifolia*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 58(9):1248-51.
- Muraina, I., Adaudi, A., Mamman, M., Kazeem, H., Picard, J., McGaw, L. y Eloff, J. 2010. Antimycoplasmal activity of some plant species from northern Nigeria

compared to the currently used therapeutic agent. *Pharmaceutical Biology* 48(10):1103-1107.

Nagda, K.K. y Deshmukh, B., 1998. Hemagglutination pattern of galactose specific lectin from *Pedilanthus tithymaloides* in diabetes mellitus. *Indian Journal of Experimental Biology* 36:426-428.

Nallamsetty, S., Kundu, S. y Jagannadham, M.V. 2003. Purification and biochemical characterization of a highly active cysteine protease ervatamin A from the látex of *Ervatamia coronaria*. *Journal of Protein Chemistry* 22(1):1-13.

Nawrot, R., Wolun-Cholewa, M. y Gozdzicka-Józefiak, A. 2008. Nucleases isolated from *Chelidonium majus* L. milky sap can induce apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells but not in Chinese Hamster ovary CHO cells. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 46(1):79-83.

Nielsen, P., Nishimura, H., Otvos, J. y Calvin, M. 1977. Plant crops as a source of fuel and hydrocarbon like materials. *Science* 198:942.

Norioka, S., Oneyama, C., Takuma, S., Shinkawa, T., Ishimizu, T., Nakanishi, T. y Sakiyama, F. 2007. Purification and characterization of a non-S-RNase and S-RNases from styles of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Plant Physiology and Biochemistry* 45(12):878-86.

Organización Mundial de la Salud. 2011. Datos y estadísticas. Accesible en <http://www.who.int/es>.

Organización Mundial de la Salud. 2012. Estadísticas sanitarias mundiales. Accesible en

http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/ES_WHS2012_Full.pdf.

- Pal, G. y Sinha, N. 1980. Isolation, crystallization and properties of Calotropis DI and DII from *Calotropis gigantea*. Archives of Biochemical and Biophysica 202: 321-329.
- Palocci, C., Soro, S., Cernia, E., Fiorillo, C., Belsito, C., Monacelli, B., Delle G. y Pasqua, G. 2003. Lipolytic isoenzymes from *Euphorbia* látex. Plant Science 165:577-582.
- Pande, M., Dubey, V.K., Yadav, S.C. y Jagannadham, M.V. 2006. A novel serine protease cryptolepain from *Cryptolepis buchanani*: purification and biochemical characterization. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54 (26):10141-10150.
- Patel, A.K., Sing, V.K. y Jagannadham, M.V. 2007. Carnein, a serine protease from noxious plant weed *Ipomoea carnea* (morning glory). Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(14):5809-5818.
- Pettit, G.R., Ducki, S., Tan, R., Gardella, R.S., McMahon, J.B., Boyd, M.R., Pettit, G.R. III, Blumberg, P.M., Lewin, N.E., Doubek, D.L. y Williams, M.D., 2002. Isolation and structure of pedilstatin from a Republic of Maldives *Pedilanthus* sp. Journal of Natural Products 65:1262–1265.
- Porta, C., Paglino, C. y Mutti, L. 2008. Ranpirnase and its potential for the treatment of unresectable malignant mesothelioma. Review. Biologics: Targets & Therapy 2(4):601-609.

- Rajesh, R., Nataraju, A., Gowda, C., Frey, B. y Vishwanath, B. 2006. Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* látex: action on human fibrinogen and fibrin clot. *Biochimie* 88:1313-1322.
- Ram, V. y Kumari, S. 2001. Natural products of plant origin as anticancer agents. *Drug News Perspective* 14(8):465-482.
- Rasikari, H.L., Leach, D.N., Waterman, P.G., Spooner-Hart, R.N., Basta, A.H., Banbury, L.K., Winter, K.M. y Forster, P.I. 2005. Cytotoxic clerodane diterpenes from *Glossocarya calcicola*. *Phytochemistry* 66 (24):2844-2850.
- Ravikanth, V., Niranjana, V., Prabhakar, T., Diwan, P., Ramakrishna, S. y Venkateswarlu, Y. 2002. Macrocyclic diterpenes from *Euphorbia nivulia*. *Phytochemistry* 59:331-335.
- Ravikanth, V., Niranjana, V., Vijender, A., Diwan, P. y Venkateswarlu, Y. 2003. Diterpenes from the látex of *Euphorbia nivulia*. *Biochemical Systematics and Ecology* 31:447-449.
- Renvoize, C., Biola, A., Pallardy, M. y Breard, J. 1998. Apoptosis: identification of dying cells. *Cell Biology and Toxicology* 14(2):111-120.
- Repetto, M. 1997. *Toxicología fundamental*. 3^a Ed. Diaz de Santos S.A. España. 406 p.
- Rossi, D., Bruni, R., Bianchi, N., Chiarabelli, C., Gambari, R., Medici, A., Lista, A. y Paganetto, G. 2003. Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* (Muell.Arg.) látex. *Phytomedicine* 10(2-3):139-144.

- Roy, S., Sehgal, R., Padhy, B. y Kumar, V. 2005. Antioxidant and protective effect of látex of *Calotropis procera* against alloxan-induced diabetes in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 102(3):470-473.
- Rudenskaya, G., Bogacheva, A., Preusser, A., Kuznetsova, A., Dunaevsky, Y., Golovkin, B. y Stepanov, V. 1998. Taraxalisin A serine proteinase from dandelion, *Taraxacum officinale*. *FEBS Letter* 437: 237-240.
- Rueda, E. 2011. Actividad ribonucleasa en el látex de *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides*. Trabajo de Ascenso Asociado. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. 82 p.
- Rutkoski, T. y Raines, R. 2008. Evasion of ribonuclease inhibitor as a determinant of ribonuclease cytotoxicity. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 9(3): 185-216.
- Sambrook, J. y Russell, D. 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Vol 1. Third Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. Sp.
- Sanchez, E., Pérez, A., Chávez, D. y Hechevarría, I. 2005. Caracterización farmacognóstica de *Pedilanthus tithymaloides* L. *Poit.* *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 10(1). Accesible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S10284796200500010004&lng=es&nrm=iso. ISSN 1028-4796.
- Sangeetha, K. y Abraham, E. 2006. Chemical modification of papain for use in alkaline medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 38(3-6):171-177.

- Segel, I. 1982. Cálculos de bioquímica. Como resolver problemas matemáticos de bioquímica general. 3^a Ed. Editorial Acribia. España. 564 p.
- Sehgal, R. y Kumar, V.L. 2005. *Calotropis procera* látex-induced inflammatory hyperalgesia-effect of antiinflammatory drugs. *Mediators of Inflammation* 31:216-220.
- Sengupta, A., Bhattacharya, D., Pal, G. y Sinha, N.K. 1984. Comparative studies on calotropins DI and DII from the látex of *Calotropis gigantea*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 232(1):17-25.
- Sequeiros, C. 2006. Caracterización bioquímica, clonado y secuenciación de endopeptidasas de origen vegetal con aplicación industrial. Accesible en [http:// www.cenpat.edu.ar/fisicambien/microb-amb.htm](http://www.cenpat.edu.ar/fisicambien/microb-amb.htm).
- Seshagirirao, K. 1995. Purification and partial characterization of a lectin from *Pedilanthus tithymaloides* látex. *Biochemical Archives* 11: 197– 201.
- Sharma, P. y Sharma, J.D. 1999. Evaluation of *in vitro* schizontocidal activity of plant parts of *Calotropis procera*-an ethanobotanical approach. *Journal of Ethnopharmacology* 68:83-95.
- Sharma, P. y Sharma, J.D. 2001. In vitro hydrolysis of erythrocytes by plant extracts with anti plasmodial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 74:239-243.
- Sing, V.K., Patel, A.K., Moir, A.J. y Jagannadham, M.V. 2008. Indicaain, a dimeric serine protease from *Morus indica* cv.K2. *Phytochemistry* 69(11):2110-2119.
- Singh, H., Kumar, S., Dewan, S. y Kumar, V. 2000. Inflammation induced by látex of *Calotropis procera* – a new model to evaluate anti-inflammatory drugs. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 43:219-224.

- Smith, H., Woerdenbag, H., Singh, R., Meulenbeld, G., Labadie, R. y Zwaving, J. 1995. Ayurvedic herbal drug with possible cytostatic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 47:75-84.
- Soares, J., Pereira, D., Freitas, C., Barreto, J., Moraes, M., Pessoa, C., Costa-Lotufo, L. y Viana, M. 2007. In vitro cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. *Toxicology in vitro* 21(8):1563-1573.
- Souza, D., Freitas, C., Pereira, D., Nogueira, F., Silva, F., Salas, C. y Ramos M. 2011. Laticifer proteins play a defensive role against hemibiotrophic and necrotrophic phytopathogens. *Planta* 234(1):183-193.
- Stirpe, F., Licastro, F., Morini, M., Parente, A., Savino, G., Abbondanza, A., Bolognesi, A., Falasca, A. y Rossi, C. 1993. Purification and partial characterization of a mitogenic lectin from the látex of *Euphorbia marginata*. *Biochimica et Biophysica Acta – General subjects* 1158:33-39.
- Sugiura, M. y Sasaki, M. 1973. Studies on proteinases from *Ficus carica* var. Horaishi. 3. Stability of ficin A, B, C and D. *Yakugaku Zasshi* 93(3):338-343.
- Taylor, R. y Cuming, A. 1993. Purification of an endoproteinase that digests the wheat “EM” protein in vitro, and determination of its cleavage sites. *FEBS Letter* 331: 76-80.
- Thakurta, P.G., Biswas, S., Chakrabarti, C., Sundd, M., Jagannadham, M.V. y Dattagupta, J.K. 2004. Structural basis of the unusual stability and substrate specificity of ervatamin C, a plant cysteine protease from *Ervatamia coronaria*. *Biochemistry* 43(6):1532-1540.

- Thao, N., Hung, T., Lee, M., Kim, J., Min, B. y Bae, K. 2010. Triterpenoids from *Camellia japonica* and their cytotoxic activity. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 58(1):121-124.
- Tiwari, S. y Singh, A. 2005. Alterations in carbohydrates and the protein metabolism of the harmful freshwater vector snail *Lymnaea acuminata* induced by the *Euphorbia tirucalli* látex extract. *Environmental Research* 99(3):378-386.
- Tomar, R., Kumar, R. y Jagannadham, M.V. 2008. A stable serine protease, wrightin, from the látex of the plant *Wrightia tinctoria* (Roxb.) R. Br.: Purification and biochemical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(4): 1479-1487.
- Tour, N. y Talele, G. 2011. Anti-inflammatory and gastromucosal protective effects of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) stem bark. *Journal of Natural Medicines* 65(3-4):598-605.
- Traore, A.S. 1992. Biogas production from *Calotropis procera*: A látex plant found in West Africa. *Bioresource Technology* 41(2):105-109.
- Tseng, M. y Safa, A. 1983. Light, fluorescent, and electron microscopic analysis of cultured breast tumor cells (T-47D) treated with 9,10 Anthracenedicarboxaldehyde bis [(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)hydrazone] dihydrochloride. *Cancer Research* 43: 5910-5914.
- Uhlig, H. 1998. *Industrial enzymes and their applications*. John Wiley and Sons. 520 p.

- Van Der Heijden, R., Jacob, D., Snoeijer, W., Hallard, D. y Verpoorte, R. 2004. The Catharanthus alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Current Medical Chemistry* 11(5):607-628.
- Varun, M., D'Souza, R., Pratas, J. y Paul, M. 2012. Metal contamination of soils and plants associated with the glass industry in North Central India: prospects of phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research International* 19(1):269-281.
- Velasco, A., Lorenzo, P., Serrano, J. y Andres-Trelles, F. 1993. Velazquez. *Farmacología*. 16^a Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. España. 1242 p.
- Vidotti, G., Zimmermann, A., Sarragiotto, M., Nakamura, C. y Días, B. 2006. Antimicrobial and phytochemical studies on *Pedilanthus tithymaloides*. Short report. *Fitoterapia* 77:43-46.
- Vierstra, R. 1996. Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Molecular Biology* 32:275-302.
- Voet, D., Voet, J. y Pratt, C. 2006. *Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular*. 2^a Ed. Editorial Médica Panamericana. España. 1130 p.
- Vogg, G., Mattes, E., Rothenburger, J., Hertkorn, N., Achatz, S y Sandermann Jr., H. 1999. Tumor promoting diterpenes from *Euphorbia leuconeura* L. *Phytochemistry* 51:289-295.
- Wang, J., Wang, X., Jiang, S., Lin, P., Zhang, J., Lu, Y., Wang, Q., Xiong, Z., Wu, Y., Ren, J. y Yang, H. 2008. Cytotoxicity of fig fruit látex against human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 46:1025-1033.

- Weber, K. y Osborn, M. 1969. The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry* 244 (16): 4406-4412.
- Welé, A., Baraguèye, C., Ndiaye, W., Fall, D., Ndoeye, I., Diop, Y., Dubosq, L. y Bodo, B. 2007. Cytotoxic activity of two cyclic peptides from the látex of *Jatropha integerrima* Euphorbiaceae. *Dakar Médical* 52(3):209-215.
- Wong, S.K., Lim, Y.Y., Abdullah, N.R. y Nordin, F.J. 2011. Antiproliferative and phytochemical analyses of leaf extracts of ten Apocynaceae species. *Pharmacognosy Research* 3(2):100-106.
- Wray, W., Bonlikas, T., Wray, V. y Hancock, R. 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 118(1):197-203.
- www.elergonomista.com/iberlátexpueden.html
- Yadav, S., Pande, M. y Jagannadham, M. 2006. Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant *Euphorbia milii*. *Phytochemistry* 67:1414-1426.

IX.- ANEXOS

ANEXO 1

Fuerza iónica de las soluciones amortiguadoras utilizadas en la extracción de las proteínas de ECL

En las disoluciones diluidas de los no electrolitos, se admite que son prácticamente iguales las actividades y las concentraciones, ya que las fuerzas electrostáticas no dan lugar a que se produzcan desviaciones importantes del comportamiento ideal. En soluciones que contienen solo electrolitos débiles se desprecian las diferencias entre las concentraciones iónicas y las actividades, debido a que el número de iones formados es bajo y las fuerzas electrostáticas prácticamente nulas. Por el contrario, en presencia de electrolitos fuertes, solos o en combinación con electrolitos débiles, como en los sistemas reguladores de pH, se requiere hacer uso de las actividades y la fuerza iónica en lugar de las concentraciones (Segel, 1982). La fuerza iónica representa la contribución de las fuerzas electrostáticas de todos los iones en disolución y se calcula a través de la siguiente ecuación

$$I = \frac{1}{2} \sum_i^n C_i Z_i^2$$

Donde:

I= Fuerza iónica expresada en unidades de concentración (mM)

C= Concentración en moles/L

Z= Valencia del ión (carga iónica)

Para realizar los cálculos, se requiere utilizar la ecuación de Hendersson-Hasselbach (HH) que relaciona la constante de disociación (Ka) del ácido débil y el pH de la disolución:

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Donde:

pH = Logaritmo negativo de la concentración de H⁺

pKa = Logaritmo negativo de la constante de disociación del ácido

A^- = Concentración de la base

HA = Concentración del ácido

Para calcular las concentraciones del par ácido-base que se utilizaron para preparar los amortiguadores correspondientes, se presentará un ejemplo para un determinado valor de pH en cada caso:

A) Acetato de sodio

B) Fosfato de sodio

C) Tris-HCl

Acetato de sodio

pH = 4,5

pK = 4,77

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Sustituyendo en la ecuación HH y despejando:

$$4,5 = 4,77 + \log \frac{[CH_3COO^-Na^+]}{[CH_3COOH]}$$

$$4,50 - 4,77 = \log \frac{[CH_3COO^-Na^+]}{[CH_3COOH]}$$

$$-0,27 = \log \frac{[CH_3COO^-Na^+]}{[CH_3COOH]}$$

$$\frac{[CH_3COO^-Na^+]}{[CH_3COOH]} = \text{antilog } -0,27$$

$$\frac{[CH_3COO^-Na^+]}{[CH_3COOH]} = 10^{-0,27}$$

$$\frac{[CH_3COO^-Na^+]}{[CH_3COOH]} = 0,537$$

$$[CH_3COO^-Na^+] = X$$

$$[CH_3COOH] = X/0,537$$

Luego, si $I = 30 \text{ mM}$,

$$I = \frac{1}{2} \sum_i^n C_i Z_i^2$$

Se sustituye en esta ecuación:

$$I = \frac{1}{2} [CH_3COO^-](1^2) + (Na^+)(1)^2]$$

$$I = \frac{1}{2} (2X) = X$$

$$I = 0,03M$$

$$[CH_3COO^-Na^+] = X = 0,03 \text{ M} = 30 \text{ mM}$$

$$[CH_3COOH] = X/0,537 = 0,03/0,537 = 0,0559 \text{ M} = 56 \text{ mM}$$

Es decir, para preparar una solución amortiguadora de acetato de sodio con una fuerza iónica de 30 mM ($I=30 \text{ mM}$) se utilizan 30 mM de acetato de sodio y 56 mM de ácido acético que constituyen el par ácido-base para una concentración final de la solución de 86 mM.

Fosfato de sodio

$$pH = 6,0$$

$$pK = 6,8$$

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Sustituyendo en la ecuación HH y despejando:

$$6,0 = 6,8 + \log \frac{[Na_2HPO_4^{-2}]}{[NaH_2PO_4^-]}$$

$$6,0 - 6,8 = \log \frac{[Na_2HPO_4^{-2}]}{[NaH_2PO_4^-]}$$

$$-0,8 = \log \frac{[Na_2HPO_4^{-2}]}{[NaH_2PO_4^-]}$$

$$\frac{[Na_2HPO_4^{-2}]}{[NaH_2PO_4^-]} = \text{antilog } -0,8$$

$$\frac{[Na_2HPO_4^{-2}]}{[NaH_2PO_4^-]} = 10^{-0,8}$$

$$\frac{[Na_2HPO_4^{-2}]}{[NaH_2PO_4^-]} = 0,158$$

$$Na_2HPO_4^{-2} = X$$

$$NaH_2PO_4^- = X/0,158$$

Luego, si I = 30 mM,

$$I = \frac{1}{2} \sum_i^n C_i Z_i^2$$

Se sustituye en esta ecuación:

$$I = \frac{1}{2} [(HPO_4^{-2})(2^2) + (H_2PO_4^-)(1)^2 + (Na)(1)^2]$$

$$I = \frac{1}{2} [(X)(2^2) + \left(\frac{X}{0,158}\right)(1)^2 + (Na_2HPO_4^{-2})(1)^2 + (NaH_2PO_4^-)(1)^2]$$

$$I = \frac{1}{2} \left[4X + \frac{X}{0,158} + 2X + \frac{X}{0,158} \right]$$

$$I = \frac{1}{2} \left[\frac{0,632X + X + 0,316X + X}{0,158} \right]$$

$$I = \frac{1}{2} \left(\frac{2,948X}{0,158} \right)$$

$$I = 9,329X$$

$$\text{Si } I = 0,03 \text{ M} \rightarrow X = 3,22 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$Na_2HPO_4^{-2} = X = 3,22 \times 10^{-3} \text{ M} = 3,2 \text{ mM}$$

Por lo tanto

$$NaH_2PO_4^{-} = X/0,158 = 0,02035 \text{ M} = 20,3 \text{ mM}$$

Es decir, para preparar una solución amortiguadora de fosfato de sodio con una fuerza iónica de 30 mM ($I=30 \text{ mM}$) se utilizan 3,2 mM de fosfato de sodio dibásico y 20,3 mM de fosfato de sodio monobásico que constituyen el par ácido-base para una concentración final de la solución de 23,5 mM.

Tris- HCl

$$\text{pH} = 7,0$$

$$\text{pK} = 8,1$$

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Sustituyendo en la ecuación HH y despejando:

$$7,0 = 8,1 + \log \frac{[Tris^0]}{[Tris^+]}$$

$$7,0 - 8,1 = \log \frac{[Tris^0]}{[Tris^+]}$$

$$-1,1 = \log \frac{[Tris^0]}{[Tris^+]}$$

$$\frac{[Tris^0]}{[Tris^+]} = \text{antilog } -1,1$$

$$\frac{[Tris^0]}{[Tris^+]} = 0,08$$

$$[Tris^+] = X$$

$$[Tris^0] = (X)(0,08)$$

Luego, si $I = 30 \text{ mM}$,

$$I = \frac{1}{2} \sum_i^n C_i Z_i^2$$

Se sustituye en esta ecuación:

$$I = \frac{1}{2} [Tris^+](1^2) + (Cl^-)(1)^2]$$

$$I = \frac{1}{2} (2X) = X$$

$$I = 0,03M$$

$$[Tris^+] = 0,03 \text{ M} = 30 \text{ mM}$$

$$[Tris^0] = 0,08 \times 0,03 = 0,0024 \text{ M} = 2,4 \text{ mM}$$

En este caso se prepara una solución de Tris base 32,4 mM y se ajusta con HCl hasta alcanzar el pH requerido.

Resumen de la preparación de los amortiguadores con igual fuerza iónica (I) utilizados en la extracción de las proteínas laticíferas

pH	$[CH_3COO^-Na^+]$ (mM)	$[CH_3COOH]$ (mM)	Total mM
4,0	30	176	206
4,5	30	56	86
5,0	30	20	50
5,5	30	6	36
	$[Na_2HPO_4^{-2}]$	$[NaH_2PO_4^-]$	
5,5	1,3	26	27,3
6,0	3,2	20,3	23,5
6,5	6,0	12	18
	$[Tris^+]$	$[Tris^0]$	
7,0	30	2,4	32,4
7,5	30	7,5	37,5
8,0	30	24	54
8,5	30	70	100
9,0	30	240	270

Para todos los amortiguadores, I = 30 mM.