

## Actividad Ribonucleasa en el Látex de *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton y *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit

Ribonuclease Activity in Latex from *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton and *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit

Emma Rueda de Arvelo<sup>1</sup>; Catalina Ramis<sup>2</sup> y Francisco Triana Alonso<sup>3</sup>

**Resumen.** Las enzimas ribonucleasas (RNAsas) han sido utilizadas con efectividad en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer y pueden tener otras propiedades aplicables en biotecnología. Con el objetivo de identificar la presencia de actividad RNasa en el látex de las plantas tropicales *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides* se colectaron muestras a partir de plantas adultas ubicadas al norte del estado Aragua, Venezuela. Las proteínas solubles fueron extraídas con acetato de sodio 50 mM pH 5 (16 µL/µg de látex) y eliminada la porción polisoprenoide por centrifugación a 16.000 x g durante 15 min. La actividad RNasa se estimó utilizando una técnica que incluye la aplicación de alícuotas de la mezcla de reacción sobre geles de poli(acrilamida-urea) y separadas por electroforesis. La degradación del sustrato fue cuantificada por densitometría. Se probaron diversos sustratos (ARN<sup>t<sub>total</sub></sup>, ARN<sup>t<sub>phe</sub></sup> y ARNm transcrito *in vitro* a partir de ADN plasmídico). El látex de ambas especies presentó actividad RNasa, con actividades específicas iniciales de 1,42 ± 0,74 µg de ARN hidrolizado/min/µg de proteína; 0,45 ± 0,18 ng de ARN hidrolizado/min/ng de proteína y 0,28 ± 0,07 ng de ARN hidrolizado/min/ng de proteína para el ARN<sup>t<sub>total</sub></sup>, ARNm transcrito y ARN<sup>t<sub>phe</sub></sup>, respectivamente, en *C. procera*, y de 0,02 ± 0,001 ng de ARN hidrolizado/min/ng de proteína para el ARNm transcrito y ARN<sup>t<sub>phe</sub></sup> en *P. tithymaloides*. Este constituye el primer reporte acerca de la presencia de enzimas RNAsas en el látex de estas especies.

**Palabras clave:** Enzima laticífera, extracto crudo, ARN, plantas tropicales.

**Abstract.** Ribonuclease enzymes (RNase) have been used effectively in the treatment of certain cancers and other properties that may be applicable in biotechnology. In order to identify the RNase activity in the latex of *Calotropis procera* and *Pedilanthus tithymaloides*, tropical plants samples were collected from adult plants located in the North State of Aragua, Venezuela. Soluble proteins were extracted with 50 mM sodium acetate pH 5 (16 µL/µg latex) and polisoprenoide portion was removed by centrifugation at 16,000 x g for 15 min. RNase activity was estimated using a technique that involves the application of reaction mixture aliquots on polyacrylamide-urea gels and separated by electrophoresis. Substrate degradation was quantified by densitometry. Various substrates were tested (tRNA<sup>total</sup>, tRNA<sup>phe</sup> and mRNA transcribed *in vitro* from plasmid DNA). The latex from both species showed RNase activity, with initial specific activities of 1.42 ± 0.74 µg of RNA hydrolyzed/min/mg protein, 0.45 ± 0.18 ng RNA hydrolyzed/min/ng protein and 0.28 ± 0.07 ng RNA hydrolyzed/min/ng protein for the tRNA<sup>total</sup>, mRNA transcribed and tRNA<sup>phe</sup>, respectively, for *C. procera*; and 0.02 ± 0.001 ng RNA hydrolyzed/min/ng protein for the mRNA transcribed and tRNA<sup>phe</sup> in *P. tithymaloides*. This is the first report of RNases enzymes in the latex from these species.

**Key words:** Laticifer enzyme, crude extract, RNA, tropical plants.

Las enzimas Ribonucleasas (RNAsas) hidrolizan enlaces fosfodiéster en numerosas formas de ARN y están presentes en todas las formas de vida celular (Aravind y Koonin, 2001). Las RNAsas son intermediarias en el flujo de la información bioquímica desde los genes hacia las proteínas; es decir, desde la transcripción hasta la traducción (Porta, Paglino y Mutti, 2008). Adicionalmente, se les ha atribuido propiedades como en el caso de la ribonucleasa seminal bovina (RSB) que presenta actividad inmunosupresora, antitumoral, embriotóxica y espermatogénica (D'Alessio *et al.*, 1997, 2001) y las RNAsas de la superfamilia T2 que

participan no solo en la degradación del ARN sino también modulando la respuesta inmune y actuando como citotoxinas extra e intracelulares (Luhtala y Parker 2010).

Las RNAsas son potencialmente citotóxicas debido a su capacidad para degradar el ARN y en consecuencia inhibir la biosíntesis de proteínas, por lo cual recientemente ha aumentado el interés en el estudio de estas enzimas, presentes en protozoarios, hongos, bacterias, virus, animales y plantas, con el fin de conocer sus estructuras, funciones, mecanismos

<sup>1</sup> Ingeniero Agrónomo. Dra. Jefe del Laboratorio de Enzimología y Toxicología. Cátedra de Bioquímica. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Final Av. 19 de abril-vía El Limón. Maracay. <emma.rueda@ucv.ve>

<sup>2</sup> Ingeniero Agrónomo. Coordinadora de Investigación. Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola. Instituto de Genética. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Final Av. 19 de abril-vía El Limón Maracay. <ramis.catalina@gmail.com>

<sup>3</sup> Licenciado en Química. Ex Director del Instituto de Investigaciones Francisco Javier Triana-Alonso (BIOMED). Escuela de Medicina. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Calle Cecilio Acosta-Las Delicias. Maracay. <ftrianaalonso@yahoo.com>

Recibido: Noviembre 23 de 2012; aceptado: Agosto 2 de 2013.

de acción y potencial biotecnológico. El interés por estas enzimas surge, en parte, de los trabajos en los cuales se ha demostrado actividad citotóxica, a bajas concentraciones, de algunas RNAsas como la RSB (D'Alessio *et al.*, 2001), y otras variantes y homólogas de la RSB como la enzima Ranpirnasa (Onconasa<sup>®</sup>) obtenida a partir de oocitos de *Rana pipiens*, una enzima 10 a 30 veces más citotóxica que la RSB (Matousek *et al.*, 2003) y utilizada en la actualidad como medicamento efectivo en el tratamiento de mesotelioma maligno, un cáncer de pulmón asociado a la exposición al asbesto y otros materiales semejantes (Singh *et al.*, 2007).

Por otra parte, es conocido el potencial farmacológico que exhiben numerosas especies de plantas, incluyendo las especies laticíferas, muchas de las cuales son utilizadas en la actualidad como fuente de principios activos para el tratamiento de enfermedades (Heijden *et al.*, 2004). *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides* son dos especies laticíferas de amplia distribución y adaptabilidad en las zonas tropicales.

*C. procera* (algodón de la India) (Familia Asclepiadaceae) es un arbusto naturalizado que suele invadir áreas alteradas y pastizales. En la India, de donde es nativa, es una planta medicinal. Sus propiedades han sido evaluadas en extractos de hojas y flores, así como en el látex. Del extracto etanólico de las flores se han reportado propiedades antimicrobiana, antiinflamatoria, antipirética, analgésica (Mascolo *et al.*, 1988), anticancerosa (Smith *et al.*, 1995) y antimalárica (Sharma y Sharma, 1999, 2001). Otros extractos de la planta en solventes orgánicos como etanol y acetona, han presentado actividades insecticida (Moursy, 1997), larvicida (Markouk *et al.*, 2000), antibacteriana y antiparasitaria (Larhsini *et al.*, 1999). Los extractos foliares, con importantes contenidos de triterpenos, antocianinas y alcaloides, presentaron efecto positivo en el control del helminto gastrointestinal *Haemonchus contortus* en pequeños rumiantes (Al-Qarawi *et al.*, 2001). Asimismo, extractos florales de *C. procera* mostraron un efecto anticoccidial en pollos de engorde inoculados oralmente, observándose una reducción significativa, dependiente de la dosis y de los efectos patogénicos asociados con *Eimeria tenella* (Zaman *et al.*, 2012).

El látex integral de *C. procera* ha sido utilizado exitosamente para purificar la enzima cruda amilasa, a partir de fermentos cultivados de *Aspergillus oryzae*, por un mecanismo de acción semejante al del ácido

poliacrílico, un polielectrolito sintético, que inclusive podría sustituir el uso de métodos convencionales para purificar enzimas, tales como la precipitación con sulfato de amonio. 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, Ahpan y Osho, 2003). Proteínas del látex de *C. procera* fueron efectivas en su actividad antifúngica contra diversos fitopatógenos, con una actividad inhibitoria preferencial hacia *R. solani* ( $IC_{50} = 20,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Souza *et al.*, 2011) y han sido probadas ser efectivas como un agente químico para destruir larvas de *Aedes aegypti* (Ramos *et al.*, 2009).

En la agroindustria, un extracto de enzimas del látex de *C. procera* fue probado como ablandador de carnes de cerdo, pollo y res. Los cortes marinados presentaron disminución del contenido de humedad y aumento significativo en la ternura, sin afectar el pH y el sabor de las carnes (Rawdkuen, Jaimakreu y Benjakul, 2013).

El látex integral de *C. procera* ha provocado efectos antioxidante y anti-hiperglicémico contra diabetes inducida por aloxano en ratas (Roy *et al.*, 2005), actividad antiinflamatoria (Kumar y Basu, 1994, Alencar *et al.*, 2004), anticoccidial (Mahmoud *et al.*, 2001), antidiarreica (Kumar *et al.*, 2001) y analgésica (Dewan, Sangraula y Kumar, 2000). El látex de esta planta ha sido utilizado para provocar inflamación de la piel y las membranas mucosas al inyectar un extracto acuoso de látex seco en la superficie podal de ratas y producir una respuesta hiperalérgica que permitió evaluar el efecto antiinflamatorio de algunas drogas como el diclofenaco, el rofecoxib y la ciproheptadina (Sehgal y Kumar, 2005), y mostró actividad anticonvulsiónante y sedante en modelos de ratones debido a una acción depresiva sobre el sistema nervioso central (Lima *et al.*, 2012). Inyecciones intraperitoneales de proteínas laticíferas redujeron marcadamente la procoagulación y la trombocitopenia en ratones infectados con *Salmonella*, lo cual fue atribuido a las actividades semejantes a la trombina y la plasmina que ejercen las proteasas laticíferas, sugiriendo un alto potencial terapéutico en condiciones asociadas con anomalías de la coagulación (Ramos *et al.*, 2012). Asimismo, fracciones conteniendo proteínas laticíferas han demostrado propiedades como agente citotóxico y anticanceroso (Soares *et al.*, 2007, Samy *et al.*, 2012, Rueda de Arvelo *et al.*, 2013).

En la mayoría de los casos, las propiedades han sido atribuidas a las enzimas laticíferas. En el látex de esta planta se ha reportado la presencia de enzimas

con actividad proteasa (Kumar y Jagannadham, 2003; Freitas *et al.*, 2007; Rueda de Arvelo, 2012), quitinasa, superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa (Freitas *et al.*, 2007).

*P. tithymaloides* (Familia Euphorbiaceae) es una planta oriunda de la América tropical, cultivada como ornamental en muchas regiones. 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, aminas, 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 *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.

Un extracto etanólico de las hojas de esta planta, 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 (Kamalakkannan *et al.*, 2010).

En relación con los componentes proteicos del látex de *P. tithymaloides*, se ha reportado una lectina específica para galactosa con actividad mitogénica en linfocitos de bazo murino (Seshagirirao, 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 una proteína, llamada pedilstatina, con acción inhibitoria de crecimiento de la línea celular de leucemia linfocítica P388 (Pettit *et al.*, 2002). Asimismo, se ha reportado una proteasa del látex, designada como "pedilantaina", con actividad antiinflamatoria oral (Dutta y Dhar, 1984; Dhar *et al.*, 1988) y se ha logrado la purificación y caracterización de una proteasa, denominada pedilanthina, con una masa molecular aproximada de 63,1 kDa (Bhowmick *et al.*, 2008).

La identificación, purificación y caracterización bioquímica de enzimas RNasas en el látex de estas plantas tropicales constituye la primera etapa de una serie de investigaciones conducentes a evaluar el

potencial uso biotecnológico de las RNasas laticíferas como posibles agentes citotóxicos y antineoplásicos. El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la actividad ribonucleasa en el extracto crudo de látex de *C. procera* y *P. tithymaloides*, dos especies con elevado potencial biotecnológico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Bioquímica de Proteínas y Ácidos Nucleicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Dr. Francisco J. Triana-Alonso" (BIOMED) de la Universidad de Carabobo (UC), Maracay, estado Aragua, Venezuela.

**Material vegetal.** Las muestras de látex fueron colectadas de plantas adultas creciendo en el Campo Experimental de la Facultad de Agronomía-Universidad Central de Venezuela (FAGRO-UCV), Maracay, estado Aragua. Las especies fueron identificadas por la Dra. Thirza Ruiz, del Instituto de Botánica-FAGRO-UCV. El látex fue colectado en viales de microcentrifuga, realizando escisiones en el tallo, y transportado de inmediato a 4 °C para obtener el extracto crudo de látex.

**Preparación del extracto crudo de látex.** El látex fue diluido con acetato de sodio 50 mM pH 5 (16 µL/µg de látex), agitado en vortex durante 1 min y centrifugado a 16.000 x g por 15 min en una microcentrifuga Eppendorf® 5415C (Hamburgo, Alemania) para descartar materiales insolubles. El sobrenadante se denominó "extracto crudo de látex" (ECL) y fue almacenado en alícuotas a -20 °C hasta su uso.

**Contenido de proteína.** Se determinó por el método de Lowry *et al.* (1951), con albúmina sérica bovina (BSA) como patrón, utilizando un espectrofotómetro Beckman DU 650® (Miami, Estados Unidos).

**Síntesis in vitro de ARNm a partir de ADN plasmídico de Escherichia coli.** El ARNm, uno de los sustratos utilizados en la determinación de la actividad RNasa, fue sintetizado por procedimientos de transcripción *in vitro* a partir de moléculas molde de ADN plasmídico obtenido de cultivos de *E. coli*, a través del procedimiento descrito a continuación.

a. **Material biológico.** Cepas de *E. coli* LX1 Blue transformadas con el plásmido pTZDec-m (Triana-Alonso *et al.*, 1995) y mantenidas a -80 °C fueron cultivadas en medio de cultivo Luria-Berthani (LB).

El cultivo celular fue preparado con 0,05 densidad óptica (DO)/mL del preinóculo y 0,2 mg/mL de ampicilina, incubado a 37 °C durante toda la noche con agitación vigorosa (200 r.p.m.) y colectadas las bacterias por centrifugación a 2.700 x g durante 15 min a 4 °C. La obtención del plásmido pTZDec-m se realizó por lisis alcalina con dodecil sulfato de sodio (maxipreparación) (Sambrook y Russell, 2001).

- b. **Digestión del ADN plasmídico con la enzima de restricción BamHI.** El ADN plasmídico aislado y purificado a partir de las cepas de *E. coli* fue linearizado utilizando la enzima *Bam HI* que reconoce e hidroliza una única secuencia del plásmido. La mezcla de reacción contenía Tris acetato 250 mM pH 7,8; acetato de potasio 1 M, acetato de magnesio 100 mM, DTT 10 mM, BSA acetilada 0,1 µg/µL; plásmido 0,25 µg/µL y 125 unidades de enzima, en un volumen final de 200 µL, se incubó a 37 °C durante 180 min, y almacenó a 4 °C durante la noche para realizar la extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (F:C:Al) y precipitación del ADN (Sambrook y Russell, 2001).
- c. **Análisis de la calidad del ADN plasmídico.** Se determinó por la relación entre la densidad óptica (DO) a 260/280 nm y por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio a voltaje constante (65 V) durante 45 min (Ogden y Adams, 1987). Se digitalizaron las imágenes por transiluminación UV a 302-365 nm en un GelDoc 1000® (BIORAD) (Hercules, EUA).

#### **Transcripción in vitro a partir de ADN plasmídico.**

Los ensayos de transcripción se realizaron de acuerdo a Triana-Alonso *et al.* (1995). Al añadir la enzima ARN polimerasa T7 se inició la incubación a 37 °C durante 4 h en un Thermo Block SLTDB-120 Seoulin Bioscience (Seul, Corea del Sur). Alícuotas de 5 µL tomadas a los 0, 30, 60, 120 y 240 min, fueron agregadas en tubos conteniendo 0,5 µL de EDTA 0,5 M pH 8, sumergidas de inmediato en nitrógeno líquido y aplicadas sobre geles de poliacrilamida-urea. La enzima ARN polimerasa T7 utilizada en los experimentos fue obtenida en trabajos previos (Rosales, 2006) a partir de cultivos de *E. coli* BL 21pAR1219 que contienen el gen de la enzima del bacteriófago T7 bajo el control del promotor del operón Lac y estuvieron almacenadas a -20 °C. Se realizaron dos extracciones con fenol al 70%, seguida de una extracción con cloroformo. Las fases acuosas fueron precipitadas con

2,6 volúmenes de etanol, mantenidas a -20 °C toda la noche y obtenidas por centrifugación a 6.000 x g por 45 min en un rotor JS13.1. El precipitado fue lavado con etanol, centrifugado y secado al vacío por 2 min en un Savant Speed Vac DNA-120-120® (Thermo Fisher Scientific, Rochester, EUA), resuspendido en agua estéril en mínimo volumen y almacenado a -20 °C. La calidad del ARNm transcrito fue evaluada por la relación entre la DO 260/280 nm y por electroforesis en geles de poliacrilamida-urea.

#### **Purificación por electroforesis preparativa del ARNm transcrito.**

El ARNm transcrito fue purificado por electroforesis preparativa (EP) (Cunningham, Kittikamron y Lu, 1996), utilizando un equipo Bethesda Research Laboratories, Inc. (NY, Estados Unidos), con una columna cilíndrica de 10 mm de diámetro y 10 cm de alto, en la cual se preparó un gel de poliacrilamida-urea de 2 cm de altura. Muestras de 120 µL de ARNm transcrito, a una concentración de 15,2 µg µL<sup>-1</sup>, fueron precipitadas agregando 12 µL de acetato de sodio 3 M pH 5,5 y 300 µL de etanol a -20 °C, centrifugadas a 16.000 x g por 30 min en la microcentrífuga Eppendorf 5415C y resuspendidas en 100 µL de tampón desnaturante para ARN antes de ser aplicadas a la columna. Los procedimientos de EP se realizaron con un flujo de 1,6 mL min<sup>-1</sup> con un tampón conteniendo Tris 50 mM, ácido acético 50 mM y EDTA 1 mM (TAE). Se colectaron fracciones de 3,2 mL en tubos que contenían 320 µL de acetato de sodio 3 M pH 5,5 y se leyó la DO a 260 y 280 nm. Alícuotas de 300 µL de cada fracción fueron precipitadas con 800 µL de etanol a -20 °C, dejadas en reposo toda la noche a -20 °C, centrifugadas a 16.000 x g por 30 min y lavadas nuevamente con etanol, para ser resuspendidas en 15 µL de tampón desnaturante para ARN y aplicadas en un gel plano de poliacrilamida-urea.

#### **Determinación de la actividad Ribonucleasa.**

El método está basado en la técnica descrita por Arends y Schön (1997), con las siguientes modificaciones: la mezcla de reacción contenía Hepes 30 mM pH 7,5, acetato de potasio 100 mM y acetato de magnesio 3 mM, con 10,6 µg del ARN utilizado como sustrato en un volumen final de 10 µL. La reacción se inició al agregar un volumen de ECL, variable de acuerdo al contenido de proteína, y la mezcla fue incubada a 37 °C durante diversos intervalos de tiempo, hasta 60 min. La reacción fue detenida sumergiendo los tubos en nitrógeno líquido después de agregarles 20 µL de tampón desnaturante conteniendo Tris-HCl 10



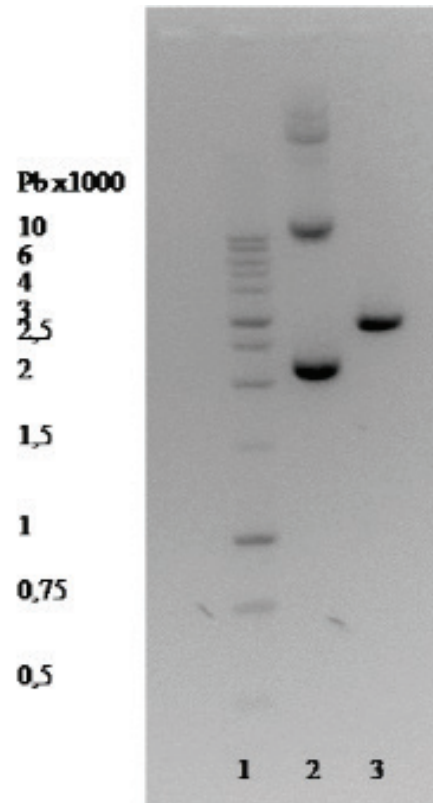
mM pH 7,5, EDTA 1 mM, urea 8 M, xileno cianol 0,05% y azul de bromofenol 0,05%. La degradación del sustrato fue cuantificada por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, urea 8 M, 0,1% de SDS, 0,25 mg mL<sup>-1</sup> de persulfato de amonio y 0,125% de Temed con un tampón preparado con Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM y EDTA 2 mM. Las muestras fueron sometidas a 70 °C durante 3 min antes de aplicarlas al gel. El gel fue pre-calentado durante 20 min a 300 V constantes. La electroforesis se realizó a 300 V constantes. Los geles fueron teñidos con azul de toluidina 0,1% y ácido acético glacial 10% (v/v) y desteñidos con 10% de etanol y 7% de ácido acético. Cuando la cantidad de ARN aplicado a los geles fue menor a 0,3 µg, se realizó tinción con nitrato de plata (An *et al.*, 2009). La cuantificación del sustrato degradado se realizó utilizando técnicas densitométricas con el programa Multianalyst en un equipo Gel Doc 1000 (BIO-RAD) (Hercules, EUA). Se probó la actividad sobre tres sustratos diferentes. El ARN<sup>total</sup> y el ARN<sup>Phe</sup> fueron obtenidos en trabajos previos (Rosales, 2006) y almacenados liofilizados a -20° C. La actividad se expresó como porcentaje de degradación del sustrato. Al graficar la superficie de la banda o la cantidad de ARN en función del tiempo se obtuvieron, para cada concentración de proteína de látex evaluada, las ecuaciones de las líneas rectas a partir de las cuales se determinaron las pendientes que representan las velocidades iniciales de reacción expresadas en unidades de superficie de banda por unidad de tiempo (UA/min), o cantidad de ARN por unidad de tiempo (µg ARN min<sup>-1</sup>). Al relacionar estos valores con la concentración de proteína de látex en la mezcla de reacción se obtuvo la actividad específica. La velocidad inicial específica, determinada en los primeros 5 min de la reacción, se expresó como µg ARN/min/µg de proteína de látex. Se realizaron pruebas utilizando diversas concentraciones de proteína de ECL sin variar la concentración del sustrato.

**Análisis estadístico.** Los datos son presentados como promedios y desviaciones estándar. Se aplicó estadística descriptiva utilizando el programa Statistix 8.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Calidad del ADN plasmídico.** La relación 260/280 DO promedio fue de 1,83 ± 0,16 de un total de 8 procesos de purificación. La Figura 1 presenta una imagen representativa de la calidad del ADN purificado antes y después de linearizar a través del ensayo de restricción con la enzima *Bam H1*. Las tres bandas observadas en el carril del plásmido sin digerir se corresponden

con parte del ADN genómico, la de mayor tamaño, seguida por el ADN circular distendido o relajado y finalmente el ADN circular superenrollado en la banda de menor tamaño. El plásmido digerido presenta una única banda ubicada entre 2500 y 3000 pb. Las bandas observadas en el gel y la relación 260/280 corroboran la calidad del ADN antes y después de linearizar, de acuerdo a lo establecido en la literatura (Sambrook y Russell, 2001).



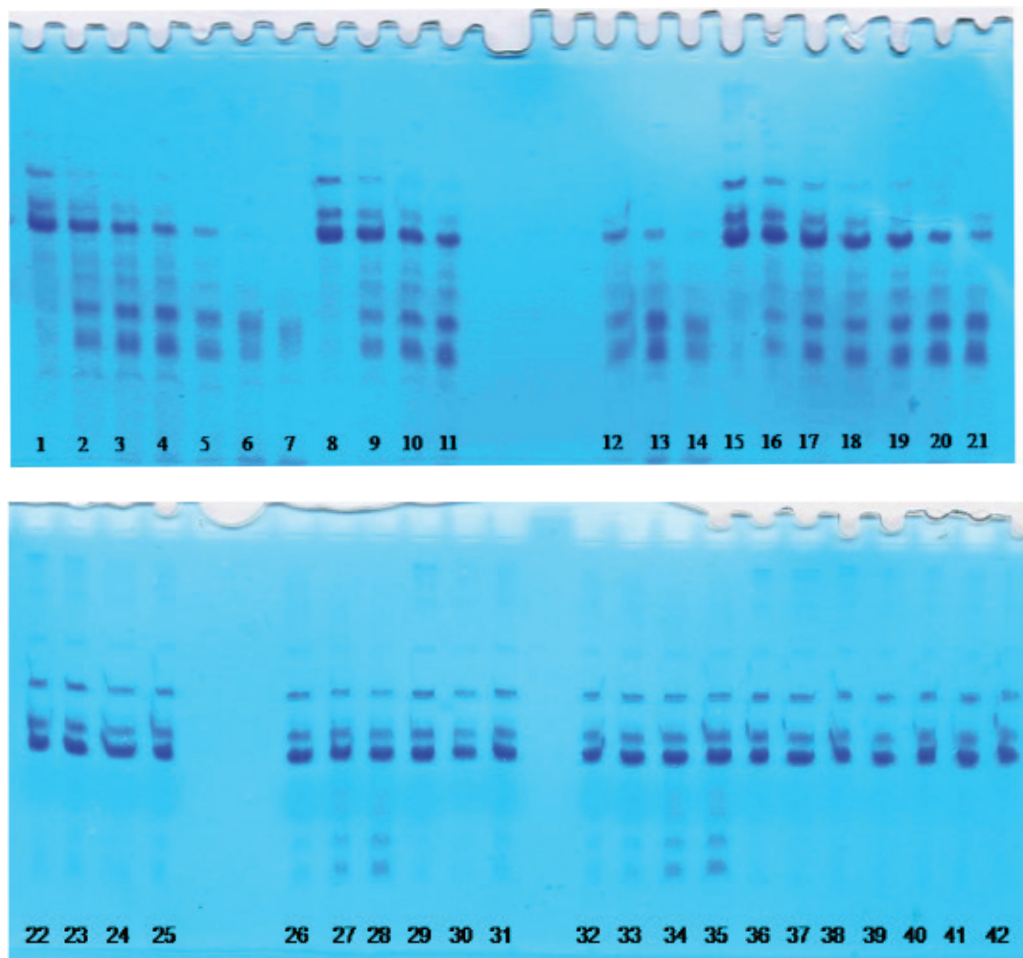
**Figura 1.** Análisis de pureza por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % del plásmido de *E coli* aislado y linearizado. Marcador de pares de bases (carril 1); plásmido sin digerir (carril 2), y plásmido linearizado después de digerir con *Bam H1* (carril 3).

### Determinación de la actividad Ribonucleasa.

**Calotropis procera.** El ARN<sup>total</sup> utilizado como sustrato se separó durante la electroforesis en 3 bandas correspondientes a 120, 93 y 76 nucleótidos (nts). Esta última es la más abundante por lo que la estimación de la actividad RNasa sobre este sustrato se realizó cuantificando la degradación de la banda de 76 nts. Los fragmentos de menor tamaño migran a mayor velocidad sobre estos geles. Se puede

observar en la Figura 2 que a medida que disminuye la intensidad de la banda correspondiente a 76 nts del ARN<sup>t</sup><sub>total</sub> se van haciendo más pronunciadas nuevas bandas que presentan menor tamaño y migran más rápidamente en el gel, correspondientes a los productos de degradación del ARN. Los resultados de la densitometría de los geles se presentan en la

Tabla 1. Las características de la mezcla de reacción se presentan en la Tabla 2. La actividad específica inicial RNasa fue de  $1,48 \pm 0,66 \mu\text{g ARN}^{\text{t}}_{\text{total}}/\text{min}/\mu\text{g}$  de proteína de látex. La actividad, probada con tres concentraciones crecientes de proteína laticífera, aumentó proporcionalmente durante los primeros diez minutos de reacción y fue mayor a medida que



**Figura 2.** Actividad RNasa del extracto crudo de látex (ECL) de *Calotropis procera* sobre ARN<sup>t</sup><sub>total</sub>. Se aplicaron alícuotas de 3,8  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción a los 0 - 2,5 - 5 - 7,5 - 10 - 30 y 60 min de incubación. 2,8  $\mu\text{g}$  de ARN/ $\mu\text{g}$  de proteína (carriles: 1-7); 5,6  $\mu\text{g}$  de ARN/ $\mu\text{g}$  de proteína (carriles: 8-14); 11,2  $\mu\text{g}$  de ARN/ $\mu\text{g}$  de proteína (carriles 15-21); 22,3  $\mu\text{g}$  de ARN/ $\mu\text{g}$  de proteína (carriles 22-28); 44,2  $\mu\text{g}$  de ARN/ $\mu\text{g}$  de proteína (carriles 29-35); sin ECL, controles negativos (carriles 36-42). Tinción con toluidina.

se incrementó la concentración de enzima (Figura 3). Con 0,4  $\mu\text{g}$  de proteína  $\mu\text{L}^{-1}$ , el sustrato se hidrolizó en un 100% a los 30 min de reacción (Tabla 1). Después de 60 min de incubación a 37 °C con el ECL en presencia del sustrato, se degradó completamente el ARN<sup>t</sup><sub>total</sub> cuando se utilizó una relación menor o igual a 5  $\mu\text{g}$  de ARN/ $\mu\text{g}$  proteína, en las mezclas de reacción en las

cuales la concentración de proteína laticífera fue de 0,2 y 0,4  $\mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$  (carriles 6 y 7 de la Figura 2). El ARN<sup>t</sup><sub>total</sub> (ARN<sup>t</sup><sub>bulk</sub>) es un sustrato hidrolizable por estas RNasas, no obstante, dificulta la medición precisa de actividad de la enzima debido a que ésta puede actuar sobre las distintas moléculas de diferentes masas moleculares. La cinética de actividad RNasa sobre ARNm transcrito y

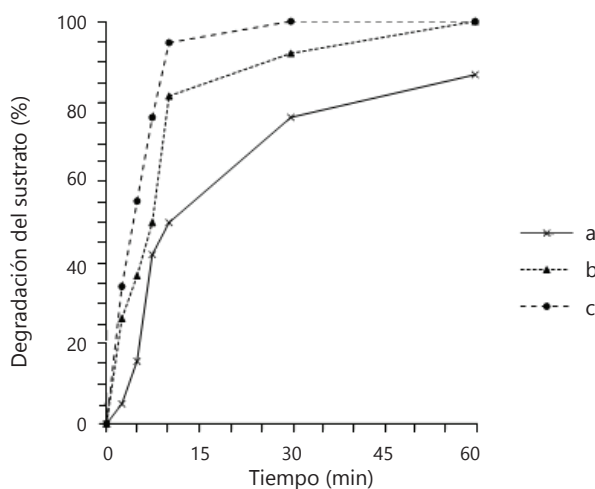
**Tabla 1.** Densitometría de geles de electroforesis en poliacrilamida-urea correspondiente al análisis cinético de degradación de ARN<sup>t<sub>total</sub></sup> por el extracto crudo de látex de *Calotropis procera*.

Proteína de látex	0,1 µg µL <sup>-1</sup>		0,2 µg µL <sup>-1</sup>		0,4 µg µL <sup>-1</sup>		
	Tiempo (min)	Superficie <sup>◊</sup> (UA) <sup>◊◊</sup>	ARN (µg)	Superficie <sup>◊</sup> (UA) <sup>◊◊</sup>	ARN (µg)	Superficie <sup>◊</sup> (UA) <sup>◊◊</sup>	ARN (µg)
	0	80,4 ± 7	3,8	72,3 ± 3	3,8	83,3 ± 2	3,8
	2,5	76,8 ± 12	3,6	52,4 ± 5	2,8	55,4 ± 1	2,5
	5	68,2 ± 6	3,2	44,7 ± 5	2,4	36,7 ± 2	1,7
	7,5	46,9 ± 8	2,2	35,3 ± 7	1,9	19,1 ± 3	0,9
	10	40,5 ± 7	1,9	13,6 ± 2	0,7	5,3 ± 1	0,2
	30	19,6 ± 9	0,9	5,9 ± 1	0,3	0	0
	60	11,6 ± 2	0,5	0	0	0	0

<sup>◊</sup>Superficie de la banda de ARN de 76 nucleótidos sin degradar; <sup>◊◊</sup> UA=Unidades arbitrarias indicadas por el equipo. Los datos son el promedio de 6 determinaciones ± desviación estándar.

**Tabla 2.** Características de la mezcla de reacción para la determinación de la actividad ribonucleasa (RNasa) del extracto crudo de látex de *Calotropis procera* sobre ARN<sup>t<sub>total</sub></sup>.

Concentraciones en la mezcla de reacción			
Proteína de látex (µg µL <sup>-1</sup> )	0,1	0,2	0,4
µg ARN/µg proteína	11,2	5,6	2,8
<b>Actividad RNasa</b>			
µg ARN min <sup>-1</sup>	0,086	0,420	0,510
µg ARN/min/µg protein	0,91	2,19	1,34

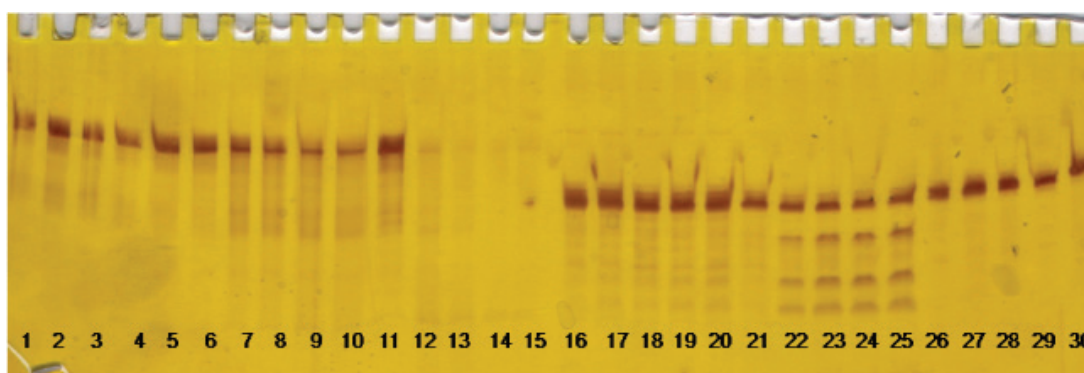


**Figura 3.** Actividad ribonucleasa del extracto crudo de látex de *Calotropis procera* sobre ARN<sup>t<sub>total</sub></sup>. En la mezcla de reacción la concentración de ARN utilizado como sustrato fue de 1,06 µg de ARN<sup>t<sub>total</sub></sup> /µL. a) 0,1 µg de proteína µL<sup>-1</sup>; b) 0,2 µg de proteína µL<sup>-1</sup> y c) 0,4 µg de proteína µL<sup>-1</sup>.

sobre ARNt<sup>phe</sup> determinada sobre el extracto crudo de látex de *C. procera* se presenta en la Figura 4. El ARNt<sup>phe</sup> contiene 76 nts de longitud (Byrne *et al.*, 2010) y el ARNm transcrito contiene 140 nts (Triana-Alonso *et al.*, 1995). Los resultados de la densitometría de los geles se presentan en la Tabla 3. Las características de la mezcla de reacción se presentan en la Tabla 4. La actividad específica promedio fue de  $0,45 \pm 0,18$  ng ARNm/min/ng de proteína de látex y de  $0,28 \pm 0,07$  ng ARNt<sup>phe</sup>/min/ng de proteína de látex. La actividad RNasa sobre el ARNm y el ARNt<sup>phe</sup> alcanzó 84 y 40% de degradación, respectivamente, después de 60 min de incubación, cuando se utilizó una proporción de 1 µg de ARN/µg

proteína (con 9,5 ng de proteína/µL) (carriles 15 y 25 de la Figura 4). En estos casos, la actividad sobre el ARN aumentó entre 20 y 48% sobre el ARNm y entre 67 y 72% sobre el ARNt<sup>phe</sup> en comparación con la actividad determinada en la mezcla de reacción conteniendo diez veces menos proteína laticífera, como se observa en la Figura 5.

***Pedilanthus tithymaloides*.** La actividad RNasa se determinó en el ECL de *P. tithymaloides* utilizando como sustratos ARNm transcrito y ARNt<sup>phe</sup>. Un gel representativo de la actividad sobre ARNm transcrito y ARNt<sup>phe</sup> se presenta en la Figura 6.



**Figura 4.** Actividad ribonucleasa del extracto crudo de látex (ECL) de *Calotropis procera* sobre ARNm y ARNt<sup>phe</sup>. Se aplicaron alícuotas de 5 µL tomadas a los 0 – 5 – 10 – 30 y 60 min de incubación. ARNm sin ECL (carriles 1-5); 10,5 µg de ARNm/µg proteína (carriles 6-10); 1,05 µg de ARNm/µg proteína (carriles 11-15); 10,5 µg de ARNt<sup>phe</sup>/µg proteína (carriles 16-20); 1,05 µg de ARNt<sup>phe</sup>/µg proteína (carriles 21-25); ARNt<sup>phe</sup> sin ECL (carriles 26-30). Tinción con nitrato de plata.

**Tabla 3.** Densitometría de geles de electroforesis en poliacrilamida-urea correspondiente al análisis cinético de degradación de ARNm transcrito y ARNt<sup>phe</sup> por el extracto crudo de látex de *Calotropis procera*.

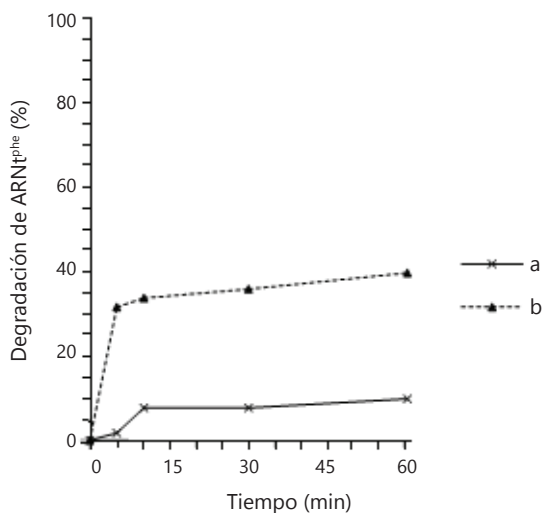
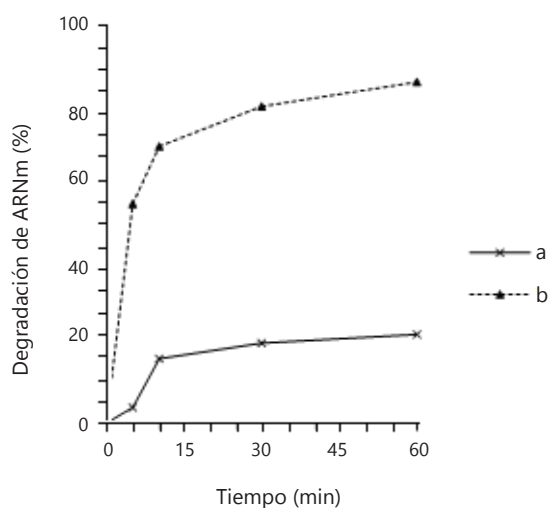
Proteína de látex	ARNm				ARNt <sup>phe</sup>			
	0,95 ng µL <sup>-1</sup>		9,5 ng µL <sup>-1</sup>		0,95 ng µL <sup>-1</sup>		9,5 ng µL <sup>-1</sup>	
Tiempo (min)	Superficie <sup>◊</sup> (UA) <sup>◊◊</sup>	ARN (ng)	Superficie <sup>◊</sup> (UA) <sup>◊◊</sup>	ARN (ng)	Superficie <sup>◊</sup> (UA) <sup>◊◊</sup>	ARN (ng)	Superficie <sup>◊</sup> (UA) <sup>◊◊</sup>	ARN (ng)
0	65,01 ±12	50	64,64 ±4	50	65,9 ±8	50	75,9±15	50
5	63,04 ±8	48	29,52 ±9	23	64,47±15	49	51,96±3	34
10	54,34 ±3	42	20,83 ±8	16	61,06 ±8	46	49,88±7	33
30	52,22 ±9	40	13,62 ±3	11	60,15 ±3	46	48,91±5	32
60	50,82 ±9	39	10,74 ±1	8	59,29 ±5	45	45,37±5	30

<sup>◊</sup>Superficie de la banda de ARN sin degradar. <sup>◊◊</sup> UA=Unidades arbitrarias indicadas por el equipo. Para cada sustrato, los datos son el promedio de 6 determinaciones ± desviación estándar.



**Tabla 4.** Características de la mezcla de reacción para la determinación de la actividad ribonucleasa (RNasa) del extracto crudo de látex de *Calotropis procera* sobre ARNm transcrito y ARNt<sup>phe</sup>.

	ARNm		ARNt <sup>phe</sup>	
<b>Concentraciones en la mezcla de reacción</b>				
<b>Proteína de látex (ng <math>\mu\text{L}^{-1}</math>)</b>	<b>0,95</b>	<b>9,5</b>	<b>0,95</b>	<b>9,5</b>
$\mu\text{g ARN}/\mu\text{g proteína}$	10,5	1,05	10,5	1,05
<b>Actividad RNasa</b>				
ngARN min <sup>-1</sup>	0,303	5,43	0,217	3,154
ngARN/min/ng proteína	0,319	0,572	0,228	0,332

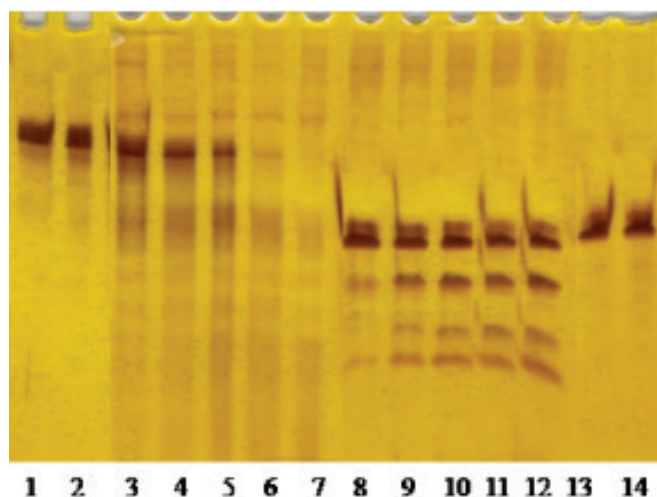


**Figura 5.** Actividad ribonucleasa en extracto crudo de látex de *Calotropis procera* sobre ARNm transcrito y ARNt<sup>phe</sup>. En la mezcla de reacción la concentración de ARN utilizado como sustrato fue 10 ng de ARN  $\mu\text{L}^{-1}$ . a) 0,95 ng de proteína  $\mu\text{L}^{-1}$ ; b) 9,5 ng de proteína  $\mu\text{L}^{-1}$ .

Los resultados de la densitometría de los geles se presentan en la Tabla 5. La velocidad inicial en los primeros 5 min de reacción, fue de  $0,02 \pm 0,001$  ng ARN /min/ng de proteína de látex para los dos sustratos evaluados. Durante el inicio de la reacción, la actividad de la RNasa presente en el ECL de *P. tithymaloides* fue semejante para ambos sustratos; no obstante, a los 60 min de incubación la degradación

de los sustratos ARNm y ARN<sup>t<sup>phe</sup></sup> fue de 84 y 32%, respectivamente (Figura 7).

La actividad RNasa presente en el látex de *P. tithymaloides* es relativamente baja, si se compara con la reportada para otras especies, como en el caso de *Chelidonium majus* (Nawrot, Wolun-Cholewa y Gozdzicka-Józefiak, 2008) y *C. procera*, los únicos

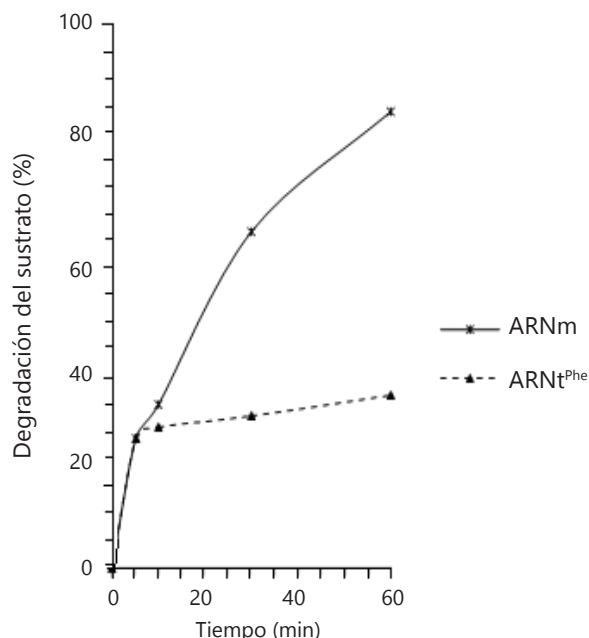


**Figura 6.** Actividad ribonucleasa del extracto crudo de látex (ECL) de *Pedilanthus tithymaloides* sobre ARNm transcrito y ARN<sup>t<sup>phe</sup></sup>. Se aplicaron alícuotas de 5  $\mu$ L de la mezcla de reacción. Controles con ARNm transcrito (10 ng/ $\mu$ L) después de 30 y 60 min de incubación sin ECL (carriles: 1 y 2); 0,13  $\mu$ g de ARNm transcrito/ $\mu$ g de proteína a los 0 -5 - 10 - 30 y 60 min (carriles 3-7); 0,13  $\mu$ g de ARN<sup>t<sup>phe</sup></sup>/ $\mu$ g de proteína a los 0-5-10-30 y 60 min (carriles 8-12); controles con ARN<sup>t<sup>phe</sup></sup> (10 ng/ $\mu$ L) después de 30 y 60 min de incubación sin ECL (carriles 13 y 14). Tinción con nitrato de plata.

**Tabla 5.** Densitometría de geles de electroforesis en poliacrilamida-urea correspondiente al análisis cinético de degradación de ARNm transcrito y ARN<sup>t<sup>phe</sup></sup> por el extracto crudo de látex de *Pedilanthus tithymaloides*.

Tiempo (min)	ARNm		ARN <sup>t<sup>phe</sup></sup>	
	Superficie <sup>◊</sup> (UA) <sup>◊◊</sup>	ARN (ng)	Superficie <sup>◊</sup> (UA) <sup>◊◊</sup>	ARN (ng)
0	108,19 $\pm$ 25	50	94,15 $\pm$ 6	50
5	81,86 $\pm$ 15	38	70,94 $\pm$ 8	38
10	74,91 $\pm$ 9	35	69,21 $\pm$ 4	37
30	40,59 $\pm$ 7	19	68,35 $\pm$ 3	36
60	16,53 $\pm$ 3	8	65,05 $\pm$ 3	34

<sup>◊</sup>Superficie de la banda de ARN sin degradar. <sup>◊◊</sup> UA=Unidades arbitrarias indicadas por el equipo. En la mezcla de reacción la concentración de ARN utilizado como sustrato fue de 10 ng de ARN / $\mu$ L y de 80 ng de proteína de ECL/ $\mu$ L. Para cada sustrato, los datos son el promedio de 6 determinaciones  $\pm$  desviación estándar.



**Figura 7.** Actividad ribonucleasa del extracto crudo de látex (ECL) de *Pedilanthus tithymaloides* sobre ARNm transcrito *in vitro* y ARNt<sup>Phe</sup>. En la mezcla de reacción la concentración de ARN utilizado como sustrato fue de 10 ng de ARN / $\mu$ L y de 80 ng de proteína de ECL/  $\mu$ L.

reportes de la actividad RNasa en látex de plantas. La degradación fue semejante durante los primeros minutos de reacción para ambos sustratos; no obstante, fue casi completa para el ARNm después de 60 min de incubación, esto puede ser debido a las diferencias estructurales de cada sustrato. Las estructuras secundarias influyen en la accesibilidad de las enzimas a los sitios específicos de identificación y acción. Posiblemente, la estructura secundaria del ARNm transcrito sea de mayor accesibilidad o posea mayor número de lugares con secuencias nucleotídicas de reconocimiento específico de la enzima. Es conocido que algunas RNasas pertenecientes a ciertas familias presentan variable especificidad de sustrato, como es el caso de las familias A y T1, las cuales tienden a ser específicas para pirimidinas o guanósina, respectivamente, a diferencia de las RNasas de la familia T2 que hidrolizan en cualquier sitio indistintamente de la base nitrogenada (Deshpande y Shankar, 2002; Irie, 1999). Estudios más detallados de las estructuras, tanto de las enzimas como de los sustratos y productos de la reacción, permitirían acercarse a una mejor caracterización de la especificidad de estas RNasas.

### CONCLUSIÓN

El látex de plantas adultas de *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides* contiene enzimas con actividad

ribonucleasa capaz de hidrolizar diferentes tipos de ARN. La actividad específica del ECL de *P. tithymaloides* fue entre 12 y 23 veces menor en comparación con la de *C. procera*. Este constituye el primer reporte acerca de la actividad RNasa en el látex de estas especies.

### AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH-UCV) por el financiamiento de la presente investigación, a través del Proyecto de Investigación N° PI-11-6939-2007/2 y la Ayuda Institucional N° AIA-11-7117-2008.

### BIBLIOGRAFÍA

Alencar, N.M. I. Figueiredo, M. Vale, F. Bitencourt, J. Oliveira, R. Ribeiro and M. Ramos. 2004. Anti-inflammatory effect of the latex from *Calotropis procera* in three different experimental models: peritonitis, paw edema and hemorrhagic cystitis. *Planta Medica* 70(12): 1144-1149.

Al-Qarawi, A. O. Mahmoud, M. Sobaih, E. Haroun, and S. Adam. 2001. A preliminary study on the antihelmintic activity of *Calotropis procera* latex against *Haemonchus*

- contortus* infection in Najdi sheep. *Veterinary Research Communications* 25(1): 61-70.
- An, Z.W. L.L. Xie, H. Cheng, Y. Zhou, Q. Zhang, X.G. He, and H.S. Huang. 2009. A silver staining procedure for nucleic acids in polyacrylamide gels without fixation and pretreatment. *Analytical Biochemistry* 391(1): 77-79.
- Ankush, R.D., K.K. Nagda, A.N. Suryakar and N.R. Ankush. 2003. Tuberculosis altering erythrocyte membrane topology - a lectin haemagglutination study. *Indian Journal of Tuberculosis* 50(2): 95-98.
- Aravind, L. and E. Koonin. 2001. A natural classification of ribonucleases. *Methods in Enzymology* 341: 3-28.
- Arends, S. and A. Schön. 1997. Partial purification and characterization of nuclear ribonuclease P from wheat. *European Journal of Biochemistry* 244(2): 635-645.
- Bhowmick, R., N. Prasanna, M. Jagannadham and A. Kayastha. 2008. Purification and characterization of a novel protease from the latex of *Pedilanthus tithymaloides*. *Protein and Peptide Letters* 15(9): 1009-1016.
- Byrne, R.T., A.L. Konevega, M. Rodnina and A. Antson. 2010. The crystal structure of unmodified tRNA<sup>Phe</sup> from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 38(12): 4154-4162.
- Cunningham, L., K. Kittikamron and Y. Lu. 1996. Preparative-scale purification of RNA using an efficient method which combines gel electrophoresis and column chromatography. *Nucleic Acids Research* 24(18): 3647-3648.
- D'Alessio, G., A. Di Donato, L. Mazarella and R. Piccoli. 1997. Ribonucleases: structures and function. pp. 383-423. Edited by D'Alessio, G. & J. F. Riordan. Academic Press, New York. 570 p.
- D'Alessio, G., A. Di Donato, R. Piccoli and N. Russo. 2001. Seminal ribonuclease: preparation of natural and recombinant enzyme, quaternary isoforms, isoenzymes, monomeric forms; assay for selective cytotoxicity of the enzyme. *Methods in Enzymology* 341: 248- 263.
- Dhar, S.N., S.M. Ray, A. Roy, and S.K. Dutta. 1988. Oral anti-inflammatory activity of pedilanthain—a new proteolytic enzyme from *Pedilanthus tithymaloides* poit. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 50(5): 281-283.
- Deshpande, R. and V. Shankar. 2002. Ribonucleases from T2 family. *Critical Reviews in Microbiology* 28(2): 79-122.
- Dewan, S., H. Sangraula and V. Kumar. 2000. Preliminary studies on the analgesic activity of látex of *Calotropis procera*. *Journal of Ethnopharmacology* 73(1-2): 307-311.
- Dutta, S.K. and S.N.A. Dhar. 1984. A new proteolytic enzyme from *Pedilanthus tithymaloides*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 46: 223-224.
- Freitas, C., J. Soares, M. Miranda, N. Macedo, M. Pereira, L. Villas-Boas and M. Viana. 2007. Enzymatic activities and protein profile of látex from *Calotropis procera*. *Plant Physiology and Biochemistry* 45(10-11): 781-789.
- Heijden, R. v.d, D. Jacobs, W. Snoeijer, D. Hallard, and R. Verpoorte. 2004. The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Current Medical Chemistry* 11(5): 607-628.
- Irie, M. 1999. Structure-function relationships of acid ribonucleases: lysosomal, vacuolar and periplasmic enzymes. *Pharmacology and Therapeutics* 81(2): 77-89.
- Kamalakaran, S., P. Madhiyazhagan, A. Dhandapani, K. Murugan, and D. Barnard. 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.O., I. Akpan and M. Osho. 2003. *Calotropis procera* (Sodom apple) a potential material for enzyme purification. Short communication. *Bioresource Technology* 87(1): 133-135.
- Kumar, V. and N. Basu. 1994. Anti-inflammatory activity of the latex of *Calotropis procera*. *Journal of Ethnopharmacology* 44(2): 123-125.
- Kumar, S., S. Dewan, H. Sangraula and V. Kumar. 2001. Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. *Journal of Ethnopharmacology* 76(1): 115-118.
- Kumar, V. and M. Jagannadham. 2003. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. *Phytochemistry* 62(7): 1057-1071.



- Larhsini, M. L. Oumoulid, H. Lazrek, S. Wataleb, M. Bousaid, M. Bekkouche, M. Markouk and M. Jana. 1999. Screening of antibacterial and anti parasitic activity of six Moroccan medicinal plants. *Thérapie* 54(6): 763-765.
- Lima, R., M. Silva, C. Aguiar, E. Chaves, K. Dias, D. Macêdo, F. de Sousa, K. Carvalho, M. Ramos and S. Vasconcelos. 2012. Anticonvulsant action of *Calotropis procera* latex proteins. *Epilepsy & Behavior* 23(2): 123-126.
- Lowry, O., N. Rosebrough, L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193(1): 265-275.
- Luhtala, N. and R. Parker. 2010. T2 Family Ribonucleases: ancient enzymes with diverse roles. *Trends in Biochemistry Science*. 35(5): 253-259.
- Mahmoud, O.M., E. Haroun, M. Sobaih, O. Omer and S. Adam. 2001. Comparative efficacy of *Calotropis procera* látex and sulfadimidine against experimentally-induced *Eimeria ovinoidales* infection in Najdi lambs. *Small Ruminants Research* 42(2): 135-140.
- Markouk, M., K. Bekkouche, M. Larhsini, M. Bousaid, H. Lazrek and M. Jana. 2000. Evaluation of some Moroccan medicinal plants extracts for larvicidal activity. *Journal of Ethnopharmacology* 73(1-2): 293-297.
- Mascolo, N., R. Sharma, S.C. Jain and F. Calpasso. 1988. Ethnopharmacology of *Calotropis procera* flowers. *Journal of Ethnopharmacology* 22(2): 211-221.
- Matousek, J., J. Soucek, T. Slavík, M. Tománek, J.E. Lee, and R.T. Raines. 2003. Comprehensive comparison of the cytotoxic activities of onconase and bovine seminal ribonuclease. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Toxicology & Pharmacology* 136(4): 343-356.
- Mohamed, S., S. Saka, S.H. El-Sharkawy, A.M. Ali, and S. Muid. 1996. Antimycotic screening of 58 Malaysian plants against plant pathogens. *Pesticide Science* 47(3): 259-264.
- Moursy, L.E. 1997. Insecticidal activity of *Calotropis procera* extract on the fleshy fly, *Sarcophaga haemorrhoidalis* fallen. *Journal of Egyptian Society of Parasitology* 27(2): 505-514.
- Nagda, K.K. and B. Deshmukh, 1998. Hemagglutination pattern of galactose specific lectin from *Pedilanthus tithymaloides* in diabetes mellitus. *Indian Journal of Experimental Biology* 36(4): 426-428.
- Nawrot, R., M. Wolun-Cholewa, and A. Gozdzicka-Józefiak. 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.
- Ogden, R. and D. Adams. 1987. Electrophoresis in agarose and acrylamide gels. *Methods in Enzymology*. 152: 61-87.
- Pettit, G.R., S. Ducki, R. Tan, R.S. Gardella, J.B. McMahon, M.R. Boyd, G.R. Pettit, P.M. III, Blumberg, N.E. Lewin, D.L. Doubek and M.D. Williams. 2002. Isolation and structure of pedilstatin from a Republic of Maldives *Pedilanthus* sp. *Journal of Natural Products* 65(9): 1262-1265.
- Porta, C., C. Paglino, and L. Mutti. 2008. Ranpirinase and its potential for the treatment of unresectable malignant mesothelioma. *Review. Biologics: Targets and Therapy* 2(4): 601-609.
- Ramos, M., D. Pereira, D. Souza, E. Araújo, C. Freitas, M. Cavalheiro, M. Matos and A. Carvalho. 2009. Potential of laticifer fluids for inhibiting *Aedes aegypti* larval development: evidence for the involvement of proteolytic activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 104(6): 805-812.
- Ramos, M., C. Viana, A. Silva, C. I. Figueiredo, R. Oliveira, N. Alencar, J. Lima-Filho and V. Kumar. 2012. Proteins derived from latex of *C. procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin- and plasmin-like activities. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 385(5): 455-463.
- Rawdkuen, S., M. Jaimakreu, and S. Benjakul. 2013. Physicochemical properties and tenderness of meat samples using proteolytic extract from *Calotropis procera* latex. *Food Chemistry* 136(2): 909-916.
- Rosales, R. 2006. Actividad traduccional de un sistema mitocondrial *in vitro* derivado de placenta humana. Maracay. 190 h. Tesis Maestría en Ciencias Biomédicas Mención Bioquímica y Biología Molecular.

- Universidad de Carabobo. Facultad de Ciencias de la Salud.
- Roy, S. R. Sehgal, B. Padhy and V. Kumar, 2005. Antioxidant and protective effect of latex of *Calotropis procera* against alloxan-induced diabetes in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 102(3): 470-473.
- Rueda de Arvelo, E. 2012. 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. Maracay. 140 h. Tesis Doctorado en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía.
- Rueda de Arvelo, E., C. Ramis, G. Frail, y F. Triana-Alonso. 2013. Citotoxicidad *in vitro* de extractos laticíferos de *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton y *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit. En: Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. En imprenta.
- Samy, R.P., P. Rajendran, F. Li, N.M. Anandi, B.G. Stiles, S. Ignacimuthu, G. Sethi and V.T. Chow, 2012. Identification of a novel *Calotropis procera* protein that can suppress tumor growth in breast cancer through the suppression of NF- $\kappa$ B Pathway. *PLoS ONE*. Vol. 7, No 12, <http://www.e48514.doi:10.1371/journal.pone.0048514>; consultada: Septiembre 2013.
- Sánchez, E. A. Pérez, D. Chávez e I. Hechevarría. 2005. Caracterización farmacognóstica de *Pedilanthus tithymaloides* L. Poit. En: Revista Cubana de Plantas Medicinales. Vol. 10, No 1; [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S102847962005000100004&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962005000100004&lng=es&nrm=iso). ISSN 1028-4796; consultada: Septiembre 2013.
- Sehgal, R. and V. Kumar. 2005. *Calotropis procera* latex-induced inflammatory hyperalgesia-effect of antiinflammatory drugs. *Mediators of Inflammation*. 2005(4): 216-220.
- Seshagirirao, K. 1995. Purification and partial characterization of a lectin from *Pedilanthus tithymaloides* latex. *Biochemical Archives* 11: 197-201.
- Sharma, P. and J.D. Sharma. 1999. Evaluation of *in vitro* schizontocidal activity of plant parts of *Calotropis procera*-an ethanobotanical approach. *Journal of Ethnopharmacology* 68(1-3): 83-95.
- Sharma, P. and J.D. Sharma. 2001. *In vitro* hydrolysis of erythrocytes by plant extracts with anti plasmodial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 74(3): 239-243.
- Sambrook, J. and D. Russell. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. Vol 1. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. 999 p.
- Singh, U., W. Ardelt, S.K Saxena, D.E. Holloway, E. Vidunas, H.S. Lee, A. Saxena, K. Shogen and K.R. Acharya. 2007. Enzymatic and structural characterisation of amphinase, a novel cytotoxic ribonuclease from *Rana pipiens* oocytes. *Journal of Molecular Biology* 371(1): 93-111.
- Smith, H., H. Woerdenbag, R. Singh, G. Meulenbeld, R. Labadie and J. Zwaving. 1995. Ayurvedic herbal drug with possible cytostatic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 47(2): 75-84.
- Soares de Oliveira J., D. Pereira Bezerra, C.D. Teixeira de Freitas, M.F.J. Delano Barreto, M. Odorico de Moraes, C. Pessoa, L.V Costa-Lotufo and MV. Ramos. 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.P. C.D. Freitas, D.A. Pereira, F.C. Nogueira, F.D. Silva, C.E. Salas, and M.V. Ramos. 2011. Laticifer proteins play a defensive role against hemibiotrophic and necrotrophic phytopathogens. *Planta*. 234(1): 183-193.
- Triana-Alonso, F.J., M. Dabrowski, J. Wadzack, and K. Nierhaus. 1995. Self-coded 3'-extension of run-off transcripts produces aberrant products during *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase. *The Journal of Biological Chemistry* 270(11): 6298-6307.
- Vidotti, G., A. Zimmermann, M. Sarragiotto, C. Nakamura and B. Días. 2006. Antimicrobial and phytochemical studies on *Pedilanthus tithymaloides*. Short report. *Fitoterapia* 77(1): 43-46.
- Zaman, M.A., Z. Iqbal, R.Z. Abbas and M.N. Khan. 2012. Anticoccidial activity of herbal complex in broiler chickens challenged with *Eimeria tenella*. *Parasitology* 139(2): 237-243.