

Aislamiento y caracterización parcial de fracciones con actividad ribonucleasa a partir de latex de *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton y *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit

[Isolation and partial characterization of fractions with ribonuclease activity from latex of *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton and *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit]

Emma Rueda de Arvelo¹, Catalina Ramis² & Francisco Triana-Alonso^{†3}

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela

²Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela

³Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela

Contactos / Contacts: Emma RUEDA DE ARVELO - E-mail address: emma.rueda@ucv.ve

Abstract: In order to isolate and characterize partially ribonucleases (RNases) enzymes contained in the latex from *Calotropis procera* and *Pedilanthus tithymaloides*, samples were collected from mature plants. Soluble proteins were extracted with sodium acetate and centrifugation at 16,000 xg for 15 min and fractionated by ion exchange chromatography. Molecular mass was estimated by linear regression equations. Glycosylation tests were conducted. In both species, proteins with RNase activity showed a molecular mass between 28 and 30 kDa. No evidence of glycosylated proteins in latex from *C. procera*. In *P. tithymaloides*, RNase may be a glycosylated protein.

Keywords: Latex, ribonuclease activity, *Calotropis procera*, *Pedilanthus tithymaloides*

Resumen: Con el objetivo de aislar y caracterizar parcialmente las enzimas ribonucleasas (RNasas) contenidas en el látex de *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides*, se colectaron muestras de plantas adultas. Las proteínas solubles fueron extraídas con acetato de sodio y centrifugación a 16.000 x g durante 15 min y fraccionadas por cromatografía de intercambio iónico. Se estimó la masa molecular a través de ecuaciones de regresión lineal. Se realizaron pruebas de glicosilación. En ambas especies, las proteínas con actividad RNasa presentaron una masa molecular entre 28 y 30 kDa. No existe evidencia de proteínas glicosiladas en el látex de *C. procera*. En *P. tithymaloides* la RNasa es una proteína glicosilada.

Palabras clave: Látex, actividad ribonucleasa, *Calotropis procera*, *Pedilanthus tithymaloides*

Recibido | Received: 26 de Marzo de 2014

Aceptado | Accepted: 28 de Abril de 2015

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 27 de Octubre de 2015

Publicado en línea | Published online: 31 de Enero de 2016

Declaración de intereses | Declaration of interests: 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.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: E Rueda de Arvelo, C Ramis, F Triana-Alonso. 2016. Aislamiento y caracterización parcial de fracciones con actividad ribonucleasa a partir del latex de *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton y *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 15 (1): 18 – 28.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas ribonucleasas (RNasas) hidrolizan el ARN liberando los nucleótidos que lo constituyen, bien durante la eliminación de los fragmentos de ARN cebador en la replicación del ADN, en el procesamiento post-transcripcional del ARN ribosómico, en el procesamiento del ARN de transferencia o durante el catabolismo de las diversas formas de ARN. Por ende, en el ciclo de vida de las plantas, estas enzimas participan en el desarrollo de tejidos y órganos, en la respuesta al estrés, en la apoptosis o muerte celular programada (Dohnálek *et al.*, 2011), en el desarrollo del sistema vascular y en las respuestas a patógenos virales (Matousek *et al.*, 2003). Adicionalmente a su función metabólica, se les atribuye potencial terapéutico. Su capacidad para degradar ARN y en consecuencia inhibir la biosíntesis de proteína en los estados de transcripción y traducción le confieren efectos citotóxicos sobre ciertos tipos celulares (Ardelt *et al.*, 2009). En este sentido, el látex de numerosas especies de plantas ha sido probado tener propiedades medicinales en el tratamiento de diversos tipos de cáncer y como agente citotóxico y citostático, como es el caso de *Croton lechleri*, cuyo látex, característicamente de color rojo, presentó actividad significativa contra los daños oxidativos inducidos por la apomorfina en *Saccharomyces cerevisiae*, fue capaz de proteger células de plántulas de maíz del efecto citotóxico de la apomorfina (Lopes *et al.*, 2004), y presentó efectos antiproliferativos *in vitro* en líneas celulares leucémicas K562 (Rossi *et al.*, 2003). Así mismo, el látex de la fruta de *Ficus carica* exhibió una potente actividad citotóxica sobre 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). El efecto citotóxico del látex de *Chelidonium majus*, una planta de la familia Papaveraceae ampliamente distribuida en Europa y el oeste de Asia, fue atribuido a dos nucleasas de 20 y 36 kDa con actividad RNasa y desoxirribonucleasa (DNasa), respectivamente, las cuales provocaron inducción de la apoptosis, en células HeLa originadas de cáncer cervical humano y transformadas con virus de papiloma humano oncogénico tipo 18 (HPV18) (Nawrot *et al.*, 2008). En un modelo de ratón transgénico X15-myc de carcinoma hepatocelular, el

látex de *Calotropis procera* provocó protección total contra la hepatocarcinogénesis, sin efectos adversos, en 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, sin afectar el crecimiento de células mononucleares de sangre periférica obtenidas de individuos saludables utilizadas como control, provocando reducción significativa de la viabilidad celular e inhibición de la síntesis de ADN ($p < 0,05$) en células HL-60 (leucemia promielocítica); sin causar incremento significativo en el número de células necróticas (Soares *et al.*, 2007). Recientemente se ha reportado efecto citotóxico y citostático del látex de *C. procera* y *Pedilanthus tithymaloides* sobre células Jurkat (leucemia de linfocitos T humanos) (Rueda de Arvelo *et al.*, 2013a) y se determinó la existencia de actividad RNasa laticífera (Rueda de Arvelo *et al.*, 2013b) en ambas especies tropicales, de alta resistencia y adaptabilidad, con alto potencial biotecnológico, cuyas RNasas aún no han sido suficientemente caracterizadas funcional y estructuralmente, por lo cual el presente trabajo de investigación se realizó con el objetivo de aislar y caracterizar parcialmente las enzimas RNasas en los látices de *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides* a los fines de aportar información relacionada con la técnica utilizada en la separación de estas enzimas y algunas de sus características bioquímicas.

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 Javier Triana-Alonso” de la Universidad de Carabobo (BIOMED-UC).

Material vegetal

Las muestras de látex fueron colectadas de plantas adultas sanas que crecen en el Campo Experimental de la Facultad de Agronomía-Universidad Central de Venezuela (UCV), Maracay, Estado Aragua. Las especies fueron identificadas por la Dra. Thirza Ruiz, del Instituto de Botánica de la Facultad de Agronomía de la UCV. El látex fue colectado en

viales de microcentrifuga realizando escisiones en el tallo y transportado de inmediato a 4° C para obtener las proteínas solubles (PS).

Preparación del extracto crudo conteniendo las proteínas solubles

El látex fue diluido con 16 µL de acetato de sodio 50 mM pH 5 por cada mg de látex integral colectado, 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. El sobrenadante conteniendo las PS, denominado también extracto crudo de látex (ECL), fue almacenado en alícuotas a -20° C hasta su uso.

Contenido de proteínas

Se determinó el contenido de proteínas por el método de Lowry *et al.* (1951), utilizando albúmina sérica bovina (ASB) como patrón. A las fracciones de las cromatografías se midió la absorbancia a 260 y 280 nm (A_{260} y A_{280}) para estimar el contenido de proteínas (Sambrook & Russell, 2001), utilizando un espectrofotómetro Beckman DU 650.

Aislamiento de ribonucleasas del extracto crudo de látex de *Calotropis procera* por fraccionamiento salino

Todo el procedimiento se realizó entre 0 y 4° C. Fracciones de 20 mL de PS fueron precipitadas con sulfato de amonio sólido agregado lentamente y con agitación hasta alcanzar 20 – 40 – 60 - 80 y 100% de saturación calculados a partir de un nomograma elaborado a 25° C (Cooper, 1984). El sulfato de amonio fue previamente pulverizado con ayuda de un mortero para facilitar su disolución, agregado lentamente con agitación moderada hasta la disolución total de la sal y dejado en reposo toda la noche. Al cabo de este tiempo, las fracciones fueron centrifugadas a 16.000 x g durante 15 min en una centrífuga Beckman J2MI con rotor JA-20. Fueron colectados la totalidad de los precipitados y sobrenadantes y dializados en membranas de 3.500 Da contra Tris-HCl 32,4 mM pH 7 durante 72 h con cambios de la solución de diálisis cada 5 h hasta eliminar la totalidad del sulfato de amonio, probado a través de la reacción con cloruro de bario 0,2 M (Rueda de Arvelo, 2012). Todas las fracciones fueron almacenadas a -20° C. Alícuotas fueron utilizadas para determinar el contenido de proteína a través de las lecturas de A_{260} y A_{280} , aplicar sobre un gel de poliacrilamida al 15% para electroforesis de proteína

(SDS-PAGE) y para determinar la actividad RNasa utilizando ARN^t_{total} (ARN^t_{bulk}) de *Escherichia coli* como sustrato.

Aislamiento de ribonucleasas del extracto crudo de látex de *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides* por cromatografía de intercambio iónico

El ECL, diluido a 2,0 – 4,0 mg de proteína/mL en acetato de sodio 50 mM pH 5 se hizo pasar por columnas cromatográficas de carboximetilcelulosa (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 eluidas con un gradiente lineal de NaCl por mezcla programada hasta 1 M preparada en acetato de sodio 50 mM pH 5.

Se aplicaron volúmenes equivalentes a 6 mg de proteína y se colectaron fracciones de 1,6 mL, utilizando un colector de fracciones LKB Multirac 2111. En las cromatografías de *C. procera*, el gradiente se inició a los 6 min, llegando a 0,6 M NaCl a los 96 min y luego incrementando rápidamente hasta 1 M NaCl (a los 97 min), para liberar polipéptidos fuertemente unidos a la matriz. En la separación de *P. tithymaloides* el gradiente se inició a los 7 min alcanzando 0,5 M NaCl a los 120 min y 1 M NaCl a los 130 min. A todas las fracciones colectadas se les midió la A_{260} y A_{280} para estimar el contenido de proteínas. Alícuotas de cada fracción fueron utilizadas para determinar la actividad RNasa sobre ARN^t^{Phe} como sustrato.

Determinación de la actividad ribonucleasa

La actividad ribonucleasa (RNasa) fue determinada por 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 y 1,9 µg de PS ó 4 µL de la fracción cromatográfica, según se indica, en un volumen final de 10 µL. La mezcla de reacción fue incubada a 37° C durante 60 min. La reacción fue detenida sumergiendo los tubos en nitrógeno líquido después de agregarles 30 µL de tampón desnaturizante para muestras de ARN conteniendo tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, urea 8 M, xileno cianol 0,05% y azul de bromofenol 0,05%. Alícuotas de 20 µL de esta mezcla fueron

aplicadas a geles de poliacrilamida al 10%, urea 8 M, 0,1% de SDS, 0,25 mg/mL de persulfato de amonio y 0,125% de Temed 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 constante. La electroforesis se realizó a 300 V constante. 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 degradación del sustrato fue cuantificada 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.

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

Las muestras de ECL y fracciones provenientes de los procedimientos de separación fueron mezcladas en una proporción 1:1 v/v con un tampón desnaturante para proteínas en un volumen final de 25 µL y desnaturadas a 97° C durante 4 min. Se aplicó un volumen de muestra contentivo de 10 a 20 µg de proteína dependiendo de la pureza de la muestra. Se utilizaron geles al 15% de poliacrilamida en presencia de SDS, de acuerdo a Laemmli (1970). 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 teñidos con azul de Coomassie R250. 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).

Determinación de la masa molecular por SDS-PAGE

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 aplicaron al gel dos proteínas conocidas, ASB (Sigma®) y concanavalina A (Con A) (Amersham®). Luego de realizar la SDS-PAGE los geles fueron

teñidos con azul de Coomassie y se estimó la masa molecular de las proteínas a través de la relación entre la distancia de migración (movilidad relativa) de las proteínas en relación con las proteínas conocidas (Weber & Osborn, 1969).

Prueba de Glicosilación

Para identificar la presencia de proteínas glicosiladas en los extractos crudos 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%. Se utilizó como control positivo la proteína glicosilada peroxidasa de rábano picante que contiene 16% de carbohidratos suministrada por el fabricante.

Análisis estadístico

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

RESULTADOS

Aislamiento de RNAsas a partir del extracto crudo de látex de *Calotropis procera* por fraccionamiento salino

La prueba realizada con el propósito de intentar separar las proteínas presentes en el extracto crudo del látex de *C. procera* utilizando precipitación selectiva con sulfato de amonio indicó poca capacidad de separación, tal como se observa en la Figura 1. Con 20% de saturación no precipitó ninguna proteína, todas permanecieron en el sobrenadante. Con 40% de saturación precipitaron en baja proporción, con 60% de saturación es intermedio el efecto. Con 80 y 100% de saturación, todas las proteínas precipitan, lo cual fue corroborado con el análisis de proteína total de cada fracción recuperada. Al efectuar la medición de la actividad RNasa en alícuotas de todas las fracciones recuperadas (Figura 2), se observó que la actividad fue mayor en el sobrenadante obtenido con 40% de saturación con sulfato de amonio en comparación con el correspondiente precipitado. Con 60, 80 y 100% de saturación toda la actividad se encuentra casi en igual proporción en los precipitados. Las características visuales de ambos geles fue corroborada por análisis densitométrico.

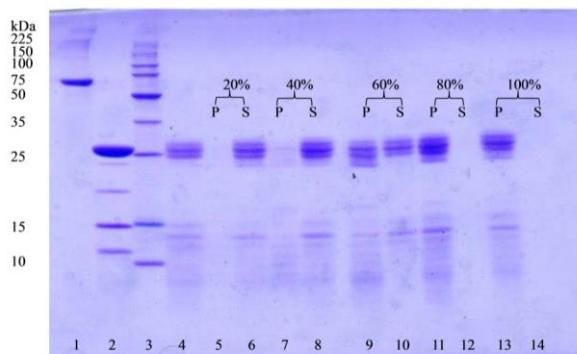


Figura 1

SDS-PAGE al 15% del extracto crudo de látex de *C. procera* después de precipitar selectivamente con sulfato de amonio. Carriles: 1) ASB Sigma® 25 µg, 2) Con A Amersham® 10 µg, 3) Marcador Promega®V849A 5 µL, 4) ECL 20 µg de proteína, 5) y 6) Precipitado y sobrenadante al 20 % de saturación, 7) y 8) Precipitado y sobrenadante al 40% de saturación, 9) y 10) Precipitado y sobrenadante al 60% de saturación, 11) y 12) Precipitado y sobrenadante al 80% de saturación, 13) y 14) Precipitado y sobrenadante al 100% de saturación. Cada una de las fracciones de la precipitación con sulfato de amonio fue aplicada al gel en un volumen correspondiente a 20 µg de proteína con 2,5 µL de tampón desnaturizante 5X para un volumen final de 25 µL.

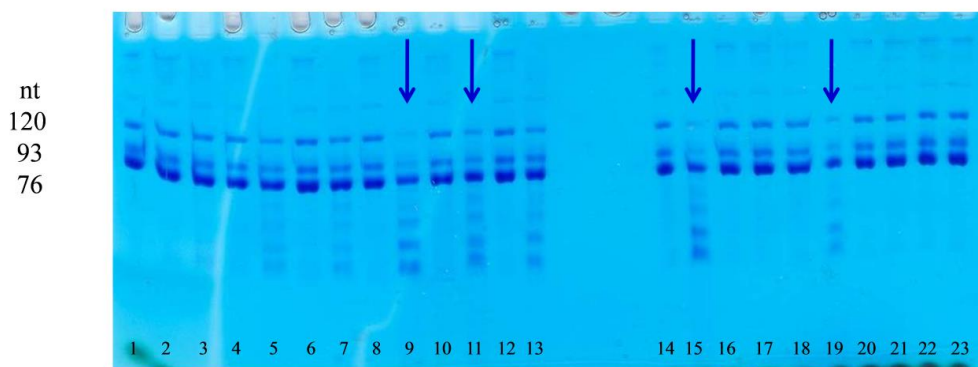


Figura 2

Actividad RNasa de las fracciones del extracto crudo de látex de *C. procera* obtenidas por precipitación con sulfato de amonio. Gel de poliacrilamida-urea. Carriles: 1) Control con 4 µg ARNttotal de *E. coli*, 2) y 3) Precipitado con 20% de saturación con 0 y 60 min de incubación, 4) y 5) Sobrenadante con 20% de saturación con 0 y 60 min de incubación, 6) y 7) Precipitado con 40% de saturación, con 0 y 60 min de incubación, 8) y 9) Sobrenadante con 40% de saturación con 0 y 60 min de incubación, 10) y 11) Precipitado con 60% de saturación con 0 y 60 min de incubación, 12) y 13) Sobrenadante con 60% de saturación con 0 y 60 min de incubación, 14) y 15) Precipitado con 80% de saturación con 0 y 60 min de incubación, 16) y 17) Sobrenadante con 80% de saturación con 0 y 60 min de incubación, 18) y 19) Precipitado con 100% de saturación con 0 y 60 min de incubación, 20) y 21) Sobrenadante con 100% de saturación con 0 y 60 min de incubación, 22) y 23) Control sin ECL con 0 y 60 min de incubación. Las muestras aplicadas al gel provienen de la reacción para determinar actividad RNasa con 1,06 µg ARNttotal/µL y 0,19 µg de proteína de ECL/µL.

Aislamiento y purificación de RNasas del extracto crudo de látex por cromatografía de intercambio iónico *Calotropis procera*

La proteína con actividad RNasa fue aislada por cromatografía de intercambio catiónico sobre una resina de carboximetilcelulosa (CM-52) y eluída con un gradiente de NaCl. Todas las fracciones fueron monitoreadas para A₂₆₀ y A₂₈₀ y actividad RNasa. Las fracciones que presentaron mayores valores de A₂₈₀

no se correspondieron con las que presentaron mayor actividad RNasa, lo que indica la presencia de otras proteínas mayoritarias diferentes a la RNasa. La proteína con actividad RNasa eluyó en las fracciones 28 a 37 entre 0,42 y 0,51 M NaCl (Figura 3), con mayor actividad en las fracciones 30 a 36 (eluídas entre 0,45 y 0,5 M NaCl) en las cuales se hidrolizó casi la totalidad del sustrato (Figura 4).

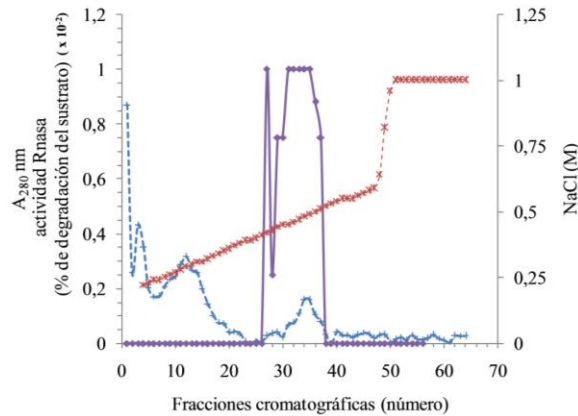


Figura 3

Separación cromatográfica de las proteínas solubles del látex de *C. procera*. Se indica la A₂₈₀ de las fracciones colectadas (---x---), el gradiente de elución de NaCl (---x---) y la actividad RNasa (—♦—) de las fracciones.

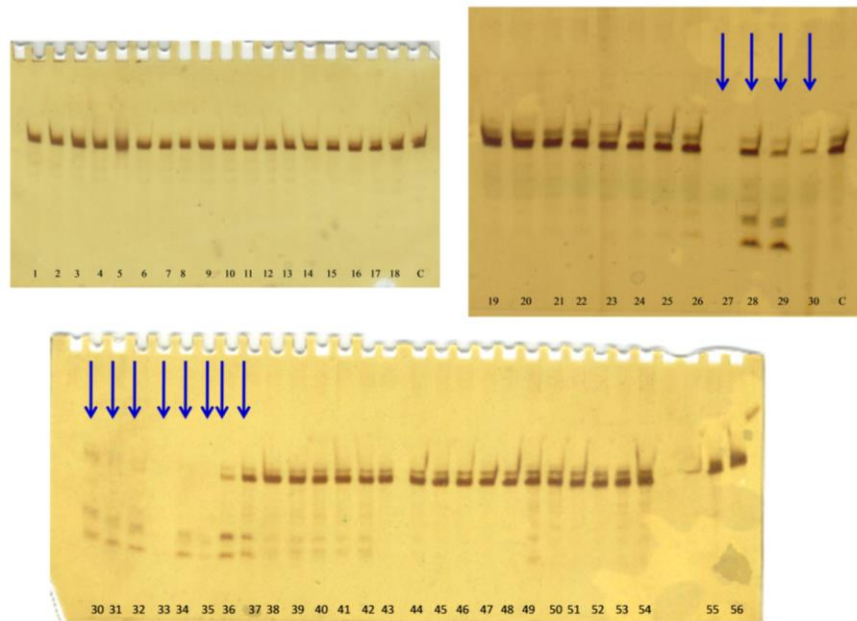


Figura 4

Actividad Rnasa de las fracciones de la cromatografía del extracto crudo de látex de *C. procera*. Los números indican cada fracción. C = control sin fracción cromatográfica.

Pedilanthus tithymaloides

Al igual que en *C. procera*, la proteína con actividad RNasa fue separada por cromatografía de intercambio catiónico sobre una resina de carboximetilcelulosa y eluída con un gradiente de NaCl. Todas las fracciones fueron monitoreadas en sus valores de A₂₆₀ y A₂₈₀ y actividad RNasa. Las fracciones que presentaron mayores A₂₈₀ no se

correspondieron con las que presentaron mayor actividad RNasa, situación semejante a la observada con la RNasa de *Calotropis procera*. La proteína con actividad RNasa eluyó en las fracciones 23 a 40 entre 0,28 y 0,4 M NaCl (Figura 5), con marcada mayor actividad en las fracciones 23 a 27 (eluídas con 0,3 M NaCl) (Figura 6).

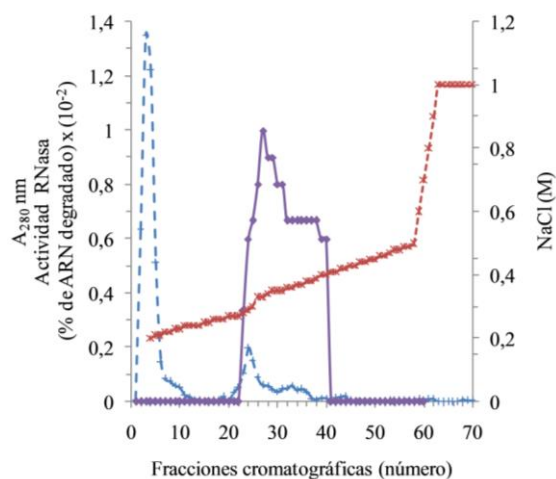


Figura 5

Separación cromatográfica de las proteínas solubles del látex de *P. tithymaloides*. Se indica la A₂₈₀ de las fracciones colectadas (--+--), el gradiente de elución de NaCl (--x--) y la actividad RNasa (—♦—) de las fracciones.

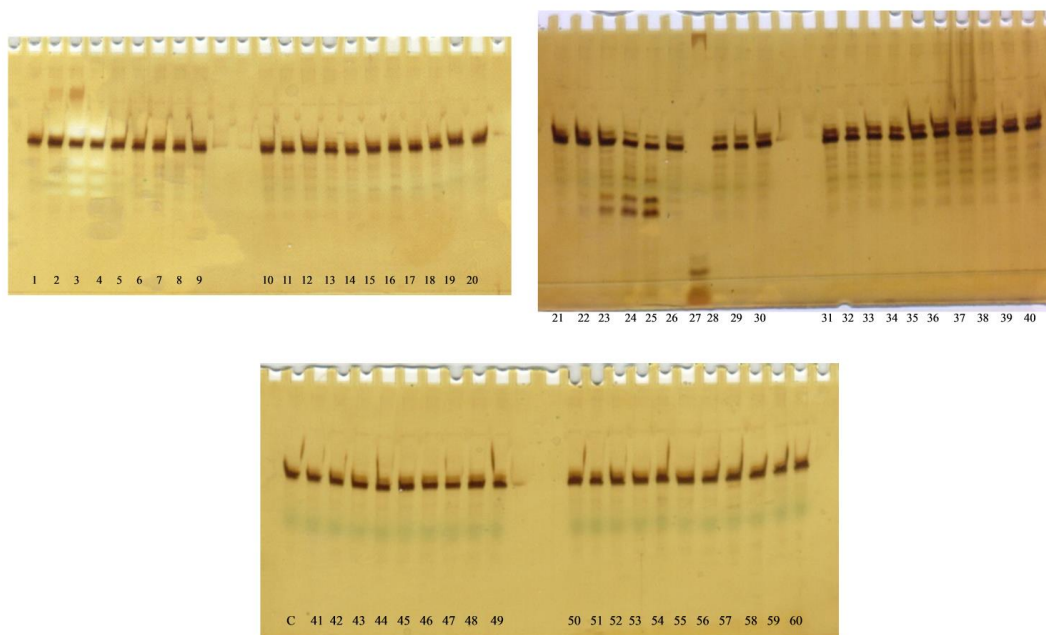


Figura 6

Actividad Rnasa de las fracciones de la cromatografía del extracto crudo de látex de *P. tithymaloides*. Los números indican cada fracción. C=control sin fracción cromatográfica.

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 RNasa en las

fracciones cromatográficas, se estimó una masa molecular de la RNasa del látex de *C. procera* entre 28 y 30 kDa (Figura 7). Resultado similar se obtuvo para la RNasa de *P. tithymaloides*, cuya masa molecular está alrededor de 28 kDa (Figura 8).

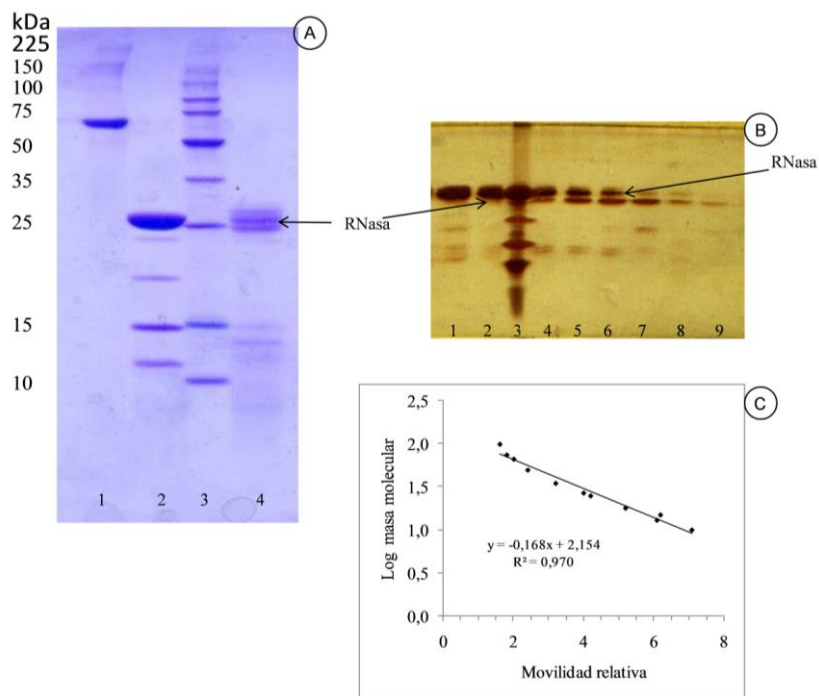


Figura 7

Análisis electroforético del extracto crudo de látex de *C. procera*.

A. SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomassie. Carriles: 1) ASB Sigma®; 2) Con A (Amersham®); 3) Marcador (Promega®); 4) ECL.

B. SDS-PAGE al 15% teñido con nitrato de plata. Carriles: 3) Con A (Amersham®); 1), 2), 4) a 9) Fracciones cromatográficas.

C. Gráfica para la estimación de la masa molecular de la RNasa.

Prueba de Glicosilación

En la Figura 9 podemos observar una imagen representativa de las pruebas de glicosilación sobre geles de SDS-PAGE al 15%. No existe evidencia de proteínas glicosiladas en el extracto crudo de látex de *C. procera*. Por el contrario, en el látex de *P. tithymaloides* es evidente la presencia de una banda glicosilada (carriles 8 y 10) y, de acuerdo a los análisis de actividad, esta proteína podría corresponderse con la RNasa encontrada en el extracto crudo de éste látex.

DISCUSIÓN

Pocos resultados se han publicado acerca de los procedimientos utilizados en el aislamiento de

enzimas con actividad RNasa. En el látex de *Chelidonium majus* (Papaveraceae) se ha reportado el aislamiento y purificación de nucleasas utilizando cromatografía de afinidad sobre columnas de heparina, encontrándose que la fracción desoxirribonucleasa (DNasa) se une a la heparina y puede ser eluída con 0,5 M de NaCl. Por el contrario, la fracción RNasa no se unió a la heparina y fue eluída a través del flujo en las fracciones, lográndose una purificación parcial (Nawrot *et al.*, 2008). La mayoría de los procedimientos de purificación de proteínas involucran uno o dos pasos de separación que suelen incluir precipitación fraccionada con sulfato de amonio seguida por al menos una separación cromatográfica. En el presente trabajo, la

precipitación con sulfato de amonio no constituyó un método efectivo para separar las proteínas del látex de *C. procera*, por lo cual este procedimiento no fue aplicado al látex de *P. tithymaloides*, realizándose separaciones cromatográficas de intercambio iónico

para ambas especies en estudio, que no ameritaron segundas fases, al obtenerse fracciones de alta pureza con solo un paso de cromatografía.

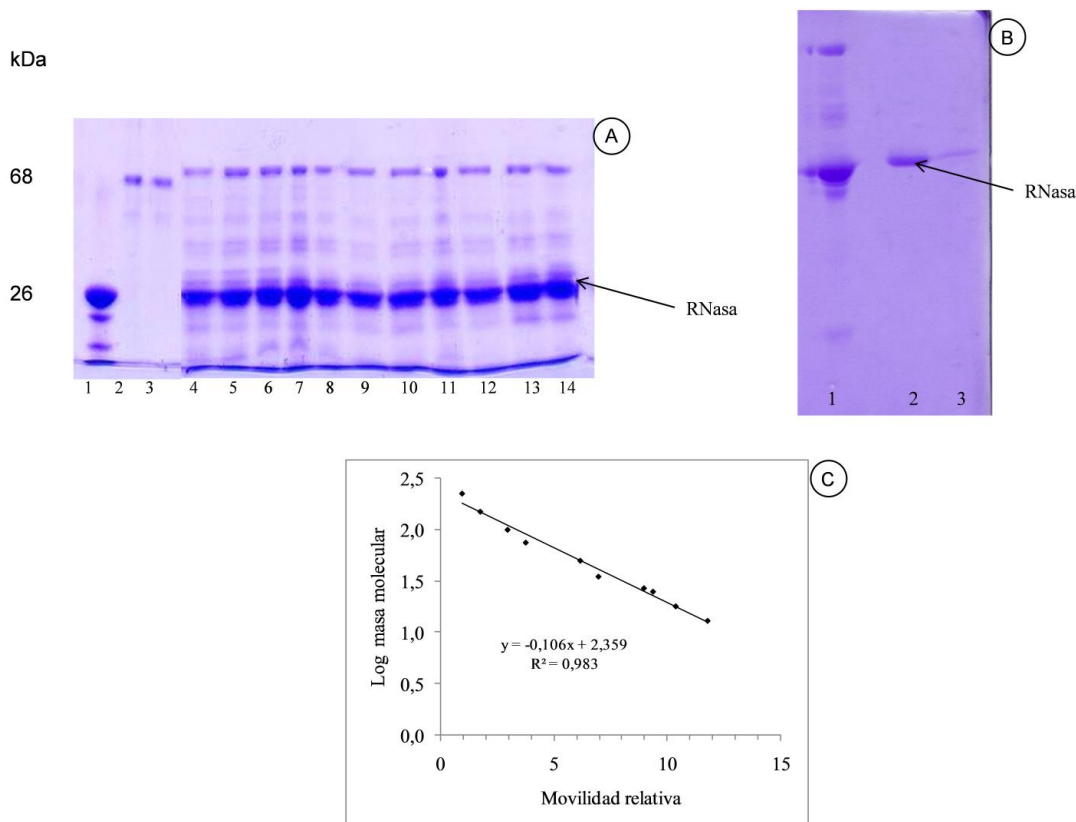


Figura 8

Análisis electroforético del extracto crudo de látex de *P. tithymaloides*.

A. SDS-PAGE al 10 %. Carriles: 1) Con A (Amersham®); 2) y 3) ASB Sigma®; 4) a 14) ECL provenientes de distintas preparaciones. B. SDS-PAGE al 15 %. Carriles: 1) ECL; 2) Fracción cromatográfica con actividad RNasa. C. Gráfica para la estimación de la masa molecular de la RNasa.

Las estimaciones de masa molecular de las RNasas de ambas especies en estudio se ubican en el rango comúnmente reportado para otras especies. Por lo general, las RNasas son enzimas de tamaño relativamente pequeño. Más específicamente, la RNasa presente en el látex de *Chelidonium majus*, la única RNasa laticífera hasta ahora reportada, es de alrededor de 20 kDa (Nawrot *et al.*, 2008). Otras RNasas vegetales, como la RNasa bifuncional de *S. lycopersicum* tiene un rango entre 31 a 35 kDa (Dohnálek *et al.*, 2011) y, en especies animales se han reportado RNasas de entre 10 y 28 kDa (Ardelt *et al.*, 2009).

En relación con la presencia de proteínas glicosiladas, dentro del grupo de las enzimas RNasas se han reportado diversos patrones de glicosilación. La nucleasa bifuncional de *Solanum lycopersicum* (Dohnálek *et al.*, 2011), algunas RNasas que pertenecen a la familia T2, como la presente en *Aspergillus oryzae* (Luhtala & Parker, 2010), las enzimas Onconasa y Amphinasas, ambas extraídas de los oocitos de *Rana pipiens* (Ardelt *et al.*, 2009), son proteínas glicosiladas. Por el contrario, son no glicosiladas la RNasa de los pistilos 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 y puede variar inclusive dentro de proteínas que pertenecen a una misma familia (Irie, 1999).

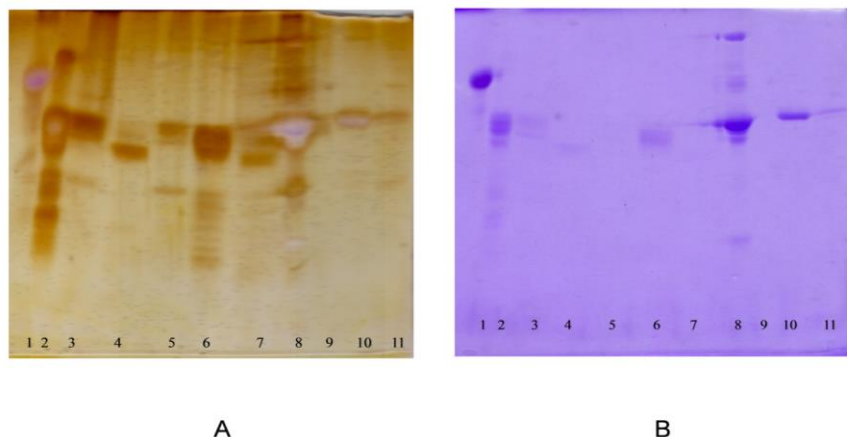


Figura 9

Prueba de glicosilación sobre SDS-PAGE al 15 % de extracto crudo de látex (ECL) y fracciones cromatográficas de *C. procera* y *P. tithymaloides*. A. Tinción con nitrato de plata, B. Tinción con azul Coomassie. En ambos casos después de aplicar la prueba de glicosilación. En A y B los carriles se corresponden a: 1) Control positivo con peroxidasa, 2) ECL de *C. procera*, 3), 5) y 6) fracciones cromatográficas de *C. procera* con actividad RNasa, 4) y 7) fracciones cromatográficas de *C. procera* sin actividad RNasa, 8) ECL de *P. tithymaloides*, 9) y 11) fracción cromatográfica de *P. tithymaloides* sin actividad RNasa, 10) fracción cromatográfica de *P. tithymaloides* con actividad RNasa.

CONCLUSIONES

Las enzimas con actividad RNasa contenidas en los látices de *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides* pueden ser aisladas utilizando un procedimiento que incluye una extracción con acetato de sodio, centrifugación y cromatografía de intercambio iónico. Estas enzimas presentan masas moleculares entre 28 y 30 kDa. La RNasa presente en el látex de *P. tithymaloides* es una proteína glicosilada. No se observó glicosilación en ninguna de las proteínas del látex de *C. procera*.

AGRADECIMIENTO

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.

REFERENCIAS

An ZW, Xie L, Cheng H, Zhou Y, Zhang Q, He XG, Huang HS. 2009. A silver staining procedure

for nucleic acids in polyacrylamide gels without fixation and pretreatment. **Anal Biochem** 391: 77 - 79.

Ardelt W, Ardelt B, Darzynkiewicz Z. 2009. Ribonucleases as potential modalities in anticancer therapy. **Eur J Pharmacol** 625: 181 - 189.

Arends S, Schön A. 1997. Partial purification and characterization of nuclear ribonuclease P from wheat. **Eur J Biochem** 244: 635 - 645.

Choedon T, Mathan G, Arya S, Kumar VL, Kumar V. 2006. Anticancer and cytotoxic properties of the látex of *Calotropis procera* in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol** 12: 2517 - 2522.

Cooper T. 1984. **Instrumentos y técnicas de Bioquímica**. Ed. Reverté, Barcelona. España.

Dohnálek J, Koval T, Lipovová P, Podzimek T, Matousek J. 2011. Structure analysis of group I plant nucleases. **J Synchrotron Radiat** 18: 29 - 30.

- Irie M. 1999. Structure-function relationships of acid ribonucleases:lysosomal, vacuolar, and periplasmic enzymes. **Pharmacol Ther** 81: 77 - 89.
- Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680 - 687.
- Lopes MI, Saffi J, Echeverrigaray S, Pêgas J, Salvador M. 2004. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. **J Ethnopharmacol** 95: 437 - 445.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem** 193: 265 - 275.
- Luhtala N, Parker R. 2010. T2 Family Ribonucleases: ancient enzymes with diverse roles. **Trends Biochem Sci** 35: 253 - 259.
- Matousek J, Soucek J, Slavík T, Tománek M, Lee J, Raines RT. 2003. Comprehensive comparison of the cytotoxic activities of onconase and bovine seminal ribonuclease. **Comp Biochem Phys C** 136: 343 - 356.
- Nawrot R, Wolun-Cholewa M, 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 Histochem Cyt** 46: 79 - 83.
- Norioka S, Oneyama C, Takuma S, Shinkawa T, Ishimizu T, Nakanishi T, Sakiyama F. 2007. Purification and characterization of a non-S-RNase and S-RNases from styles of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). **Plant Physiol Biochem** 45: 878 - 886.
- Rossi D, Bruni R, Bianchi N, Chiarabelli C, Gambari R, Medici A, Lista A, Paganetto G. 2003. Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* (Muell.Arg.) látex. **Phytomedicine** 10: 139 - 144.
- 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. Tesis Doctorado en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía, Caracas, Venezuela.
- Rueda de Arvelo E, Ramis de Da Silva C, Fraile-Vargas G, Triana-Alonso FJ. 2013a. Citotoxicidad *in vitro* de extractos laticíferos de *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton y *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 12: 476 - 492.
- Rueda de Arvelo E, Ramis de Da Silva C, Triana-Alonso FJ. 2013b. Actividad Ribonucleasa en el látex de *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton y *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit. **Rev Fac Nal Agr Medellín** 62: 7057 - 7070.
- Sambrook J, Russell D. 2001. **Molecular cloning. A laboratory manual.** Vol 1. Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Soares J, Pereira D, Freitas C, Barreto J, Moraes M, Pessoa C, Costa-Lotufo L, Viana M. 2007. In vitro cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Toxicol in vitro** 21: 1563 - 1573.
- Wang J, Wang X, Jiang S, Lin P, Zhang J, Lu Y, Wang Q, Xiong Z, Wu Y, Ren J, Yang H. 2008. Cytotoxicity of fig fruit látex against human cancer cells. **Food Chem Toxicol** 46: 1025 - 1033.
- Weber K, Osborn M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **J Biol Chem** 244: 4406 - 4412.
- Wray W, Boulikas T, Wray V, Hancock R. 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. **Anal Biochem** 118: 197 - 203.