

Citotoxicidad *in vitro* de extractos laticíferos de *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton y *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit.

[*In vitro* cytotoxicity of laticifers extracts from *Calotropis procera* (Aiton) W.T. and *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit.]

Emma Elena RUEDA DE ARVELO¹, Catalina María Ramis de DA SILVA², Germán FRAILE³
& Francisco Javier TRIANA-ALONSO^{1,3}.

¹Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Central de Venezuela. ²Facultad de Agronomía- Universidad Central de Venezuela.

³Instituto de Investigaciones Dr. Franciso Javier Triana-Alonso (BIOMED)-Universidad de Carabobo.

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

Abstract

In order to assess the anticancer action of extracts obtained by latex from *Calotropis procera* and *Pedilanthus tithymaloides*, samples were collected from adult plants. Soluble proteins were extracted with 16 µL of 50 mM sodium acetate pH 5/µg integral latex and centrifugation at 16,000 x g for 15 min, the supernatant was named "latex crude extract" (LCE). The "latex methanolic extract" (LME) was obtained on dried latex. Both extracts were tested *in vitro* by cytotoxic and cytostatic activity in Jurkat cell cultures. Cellular viability, proliferation, necrosis and apoptosis were evaluated. LCE and LME were found with cytotoxic and cytostatic activity after 24 incubation hours ($p < 0,05$) with doses from 1µg/mL. The LCE and LME of *P. tithymaloides* presented cytotoxic effect ($p < 0,05$) from 50 µg/mL and from 1µg/mL, respectively.

Keywords: látex, *in vitro* cell cultures, Jurkat cells, cytotoxic, cytostatic.

Resumen

Con el objetivo de evaluar el potencial anticanceroso de extractos de látex de *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides* se colectaron muestras de plantas adultas. Las proteínas solubles fueron extraídas con 16 µL de acetato de sodio 50 mM pH 5/µg de látex integral y centrifugación a 16.000 x g durante 15 min, denominándose al sobrenadante "extracto crudo de látex" (ECL). El "extracto metanólico de látex" (EML) se obtuvo sobre látex deshidratado. Ambos extractos fueron probados en su actividad citotóxica y citostática *in vitro* sobre cultivos de células Jurkat. Se realizaron estudios de viabilidad, proliferación, necrosis y apoptosis celular. El ECL y el EML de *C. procera* presentaron actividad citotóxica y citostática después de 24 y 48 horas de incubación ($p < 0,05$) con dosis desde 1 µg/mL. Los ECL y EML de *P. tithymaloides* presentaron efectos citotóxicos ($p < 0,05$) a partir de 50 µg/mL y desde 1 µg/mL respectivamente.

Palabras Clave: Látex, cultivos celulares *in vitro*, células Jurkat, citotóxico, citostático.

Recibido | Received: November 28, 2012

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: February 27, 2013

Publicado en línea | Published online: September 30, 2013

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 N° PI-11-6939-2007/2 y la Ayuda Institucional A-11-00-7117-2008.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: EE Rueda-de-Arvelo, CMR de Da Silva, G Fraile, FJ Triana-Alonso. 2013. 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(5): 476 – 492.

INTRODUCCIÓN



Figura 1
Calotropis procera (Aiton) W.T. Aiton

Calotropis procera (Aiton) W.T. Aiton. (Familia Asclepiadaceae) (Figura 1) es un 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” o “Algodón de seda”. En la India, es una popular planta medicinal (Sehgal *et al.*, 2006). Las características morfológicas, microscópicas y fitoquímicas de las hojas de *C. procera* han sido recientemente examinadas, reportándose azúcares, fenoles, flavonoides, saponinas, terpenoides, taninos y glicósidos en su composición (Murti *et al.*, 2013).

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). Una fracción de proteínas obtenida del extracto acuoso del tallo inhibió el crecimiento *in vitro* de *Staphylococcus aureus* y *Enterobacter aerogenes* a

una concentración de 25 µg/mL con una eficiencia comparable a la del cloramfenicol utilizado como control positivo (Samy y Chow, 2012). Extractos foliares con importantes contenidos de triterpenos, antocianinas y alcaloides fueron efectivos en el control del helminto gastrointestinal *Haemonchus contortus* en pequeños rumiantes (Al-Qarawi *et al.*, 2001). 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; Sharma y Sharma, 2001).

El efecto hipoglucémico y antidiabético también ha sido evaluado en extractos metanólicos foliares, no encontrándose ningún efecto cuando se suministró en forma oral en dosis de 100 y 250 mg/Kg en ratones (Rahmatullah *et al.*, 2010), contrario a lo encontrado en extractos clorofórmicos de flores y hojas de *C. gigantea*, una especie de igual género, que

provocaron disminución en las concentraciones de glucosa en sangre de ratas diabéticas y no diabéticas (Rathod *et al.*, 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), analgésica (Dewan *et al.*, 2000), antioxidante y antidiabética (Roy *et al.*, 2005). El extracto metanólico de látex, suministrado diariamente en una dosis oral de 500 mg/Kg fue capaz de atenuar

significativamente ($p < 0,05$) la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo en ratas con monoartritis inducida, con una intensidad semejante a la dosis de 100 mg/Kg de la droga comercial rofecoxib (Kumar y Roy, 2007). No obstante, antagónicamente, el látex puede producir inflamación de la piel y membranas mucosas, por lo cual ha sido utilizado para producir un modelo de estudio de estos procesos (Kumar y Shivkar, 2004) y en la evaluación de compuestos con potencial actividad antiinflamatoria y antinociceptiva (Padhy y Kumar, 2005).



Figura 2
Pedilanthus tithymaloides (L.) Poit.

Pedilanthus tithymaloides (L.) Poit. (Familia Euphorbiaceae) (Figura 2) es una planta oriunda de 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). Abreu *et al.*, (2006) han señalado que esta planta tiene usos tradicionales como emético, antiinflamatorio, antibiótico, antiséptico, antihemorrágico, antiviral, abortivo y como agente antitumoral. No todas estas propiedades han sido comprobadas en trabajos

experimentales, no obstante, se ha reportado que el extracto etanólico de las hojas presentó actividad antimicrobiana, semejante a la tetraciclina, sobre *Pseudomonas aeruginosa* (Vidotti et al., 2006). En este mismo orden de ideas, 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 (Kamalakkannan et al., 2010).

Una de las propiedades atribuidas, 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, 2012). 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 más de 40 años como una droga anticancerosa (van Der Heijden et al., 2004). 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* (Kummalu, 2005) y *Podophyllum peltatum* (Ram y Kumari, 2001); utilizadas en la actualidad para combatir efectivamente adenocarcinomas de próstata, colon y cáncer de pulmón. 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, con valores de IC₅₀, la concentración a la cual se produce la inhibición, en un 50 %, del crecimiento celular, entre 1,3 y 3,3 µg/mL (Wong et al., 2011).

En muchos casos, la actividad antineoplásica de las plantas laticíferas es atribuida a los terpenos (Chang et al., 2005; Rasikari et al., 2005; Choedon et al., 2006; Bishayee et al., 2011), no obstante, 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. Recientemente, una proteína aislada de las raíces de *C. procera* inhibió la proliferación e indujo la apoptosis de células de cáncer de seno *in vitro* e *in vivo*, al suprimir la activación del factor nuclear kappa-B (NF-κB), en forma comparable a la droga ciclofosfamida, utilizada comúnmente (Samy et al., 2012). Así mismo, se ha demostrado actividad antileucémica del cardenólido semisintético UNBS1450, perteneciente a la familia de glicósidos esteroides cardíacos derivados de *C. procera* (Juncker et al., 2010).

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 citotóxico y citostático de extractos de látex de *C. procera* y *P. tithymaloides*, como posibles agentes anticancerosos, en cultivos *in vitro* de células Jurkat de leucemia linfocítica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las muestras de látex fueron colectadas de plantas silvestres de *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton. y *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit. creciendo en el Campo Experimental de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela (UCV), Maracay, 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 fue colectado en viales de microcentrífuga realizando escisiones en el tallo y transportado de inmediato a 4 °C para obtener el extracto crudo, contenido de proteínas solubles. Para obtener la fracción metanólica con terpenos, el látex fue colectado y transportado al laboratorio a temperatura ambiente.

Preparación del extracto crudo de látex de *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides*

El látex colectado fue diluido con acetato de sodio 50 mM pH 5, en una proporción de 16 μ L de tampón/mg de látex, 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 principalmente proteínas solubles, se denominó "extracto crudo de látex" (ECL) y fue almacenado en alícuotas de 2 mL a -20 °C, hasta su uso, en no más de 15 días, para los estudios de citotoxicidad.

Contenido de proteína

Se determinó el contenido de proteínas en el ECL (Lowry *et al.*, 1951). Brevemente, 5 μ L de muestra, diluís hasta 100 μ L con agua destilada, se hicieron reaccionar con 500 μ L de una solución conteniendo 0,1 M de NaOH, 2% de Na₂CO₃, 0,5% de tartrato de sodio, 0,5 % de SDS y 0,1 mg/mL de sulfato de cobre. Transcurridos 10 min se agregó 50 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu previamente diluido 1:1 en agua destilada. La absorbancia fue leída después de 30 min a 660 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650. El contenido de proteína fue calculado utilizando la ecuación de regresión obtenida a partir de una gráfica elaborada con albúmina sérica bovina como estándar.

Preparación del extracto metanólico de látex de *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides*

El látex colectado para extraer la fracción metanólica enriquecida 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, distribuído 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 enriquecido de terpenos, con trazas de otros compuestos de naturaleza hidrofóbica (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, en menos de 15 días. 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 dimetil sulfóxido (DMSO) para lograr las concentraciones requeridas.

Identificación de la fracción terpénica

Para identificar la presencia de terpenos en los EML se realizó la prueba de determinación colorimétrica de Liebermann-Burchard (Kenny, 1952). La formación de color ámbar a verde oscuro indicó una reacción positiva, correspondiente a una fracción enriquecida con triterpenos (Mu *et al.*, 2010). El colesterol fue utilizado a una concentración de 3 mg/mL como un control cualitativo.

Cultivo celular

Las células 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, Venezuela. 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 suero fetal bovino (SFB), penicilina (100 u/mL) y estreptomycin (100 μ g/mL) a 37 °C en 5% de CO₂ en un incubador Nuair NU-8500.

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 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (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 μ L de suspensión celular a una concentración inicial de 250 x 10³ cel/mL, a las cuales se agregó, después de 24 horas, 8 μ L del ECL, preparado en acetato de sodio 50 mM pH = 5, a la concentración requerida para dar una concentración final de proteínas laticíferas de 1, 10, 50 y 100 μ g/mL. En ambas especies, el ECL inicial se ajustó a 2,5 μ g de proteína laticífera/ μ L, a partir del cual se prepararon, para cada concentración evaluada, una solución a una

dilución específica, de manera que la concentración final de proteína laticífera de ECL fuese la indicada, en un volumen final de 200 μL . Se realizaron controles en los cuales el ECL fue sustituido por la misma cantidad de acetato de sodio 50 mM pH 5. Cuando se evaluó el EML, se agregó 1 μL diluido en DMSO para una concentración final de 1, 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En ambas especies, el EML se ajustó a 30 μg de fracción terpenoide/ μL , a partir del cual se prepararon soluciones a las concentraciones correspondientes de manera que la concentración final de fracción terpenoide fuese la indicada, en un volumen final de 200 μL . En todos los casos, la concentración final del DMSO fue de 0,5 % para evitar riesgos de toxicidad (Tseng y Safa, 1983). Se realizaron controles en los cuales el EML fue sustituido por la misma cantidad de DMSO.

Luego de 0, 24 y 48 horas de incubación a 37 °C en 5% CO_2 se transfirieron 100 μL de suspensión celular a placas de fondo plano de 96 pozos en los cuales se añadió 10 μL de MTT (5 mg/mL). Se incubó la placa por 4 horas a 37 °C y 5% CO_2 luego de lo cual se añadió 100 μL 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 absorbancia a 550 nm 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. El efecto citostático se expresó como Índice de Proliferación (IP) relacionando la densidad óptica correspondiente a la reducción de la tintura MTT a 550 nm con respecto al control a la hora cero.

b.- Necrosis y apoptosis celular

Exclusión del azul tripano

Se incubaron 96 μL de suspensión celular a una concentración inicial de 10^6 células/mL de medio específico y 4 μL de ECL 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 Nuair 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 fosfato 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 (Hathaway et al. 1964). El vehículo de disolución del ECL fue utilizado como control positivo (acetato de sodio 50 mM pH 5). 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

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% CO_2 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 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 (Renvoize et al., 1998). Se realizaron controles en presencia de acetato de sodio 50 mM pH = 5,0. El efecto fue expresado como viabilidad, necrosis o apoptosis celular relativa usando las siguientes fórmulas:

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

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

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

Diseño experimental y análisis estadístico

Los experimentos se realizaron con un diseño completamente al azar. Los datos, presentados como

promedio \pm desviación estándar, 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.

RESULTADOS

Extracción de proteína y fracción terpenoide

Los ECL y EML fueron cuantificados en relación con su contenido de proteína y terpenos, respectivamente. El contenido promedio de proteína del ECL *C. procera* y *P. tithymaloides* fue de $40,5 \pm 8,2$ mg/mL y $60,8 \pm 14,0$ mg/mL, respectivamente. Así mismo, el contenido promedio de terpenos o fracción terpenoide en los EML fue de 4% en *C. procera* y 1,8% (p/v) en *P. tithymaloides*.

Efectos citotóxico y citostático de los extractos crudos de látex *Calotropis procera*

a.- Viabilidad y proliferación celular

La viabilidad de las células Jurkat, determinada en presencia del ECL de *C. procera* y expresada como porcentaje del control correspondiente, disminuyó significativamente ($p < 0,05$), con respecto al control a todas las dosis evaluadas, a las 24 y 48 horas (Figura 3), 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 con respecto al control ($p < 0,05$), y, al igual que en la viabilidad, con un efecto poco marcado dependiente de la dosis (Figura 3).

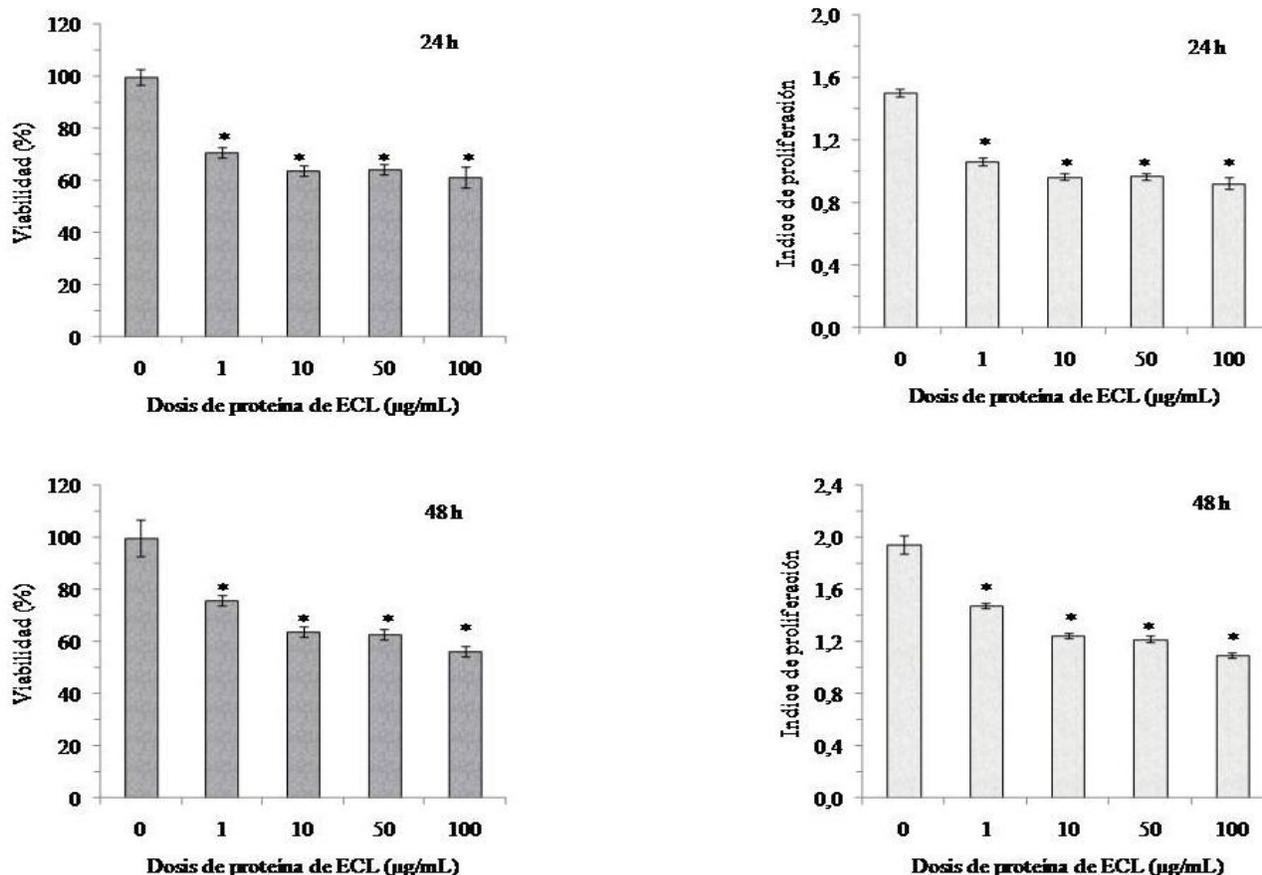


Figura 3

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 proteínas solubles de ECL. En los controles el ECL fue sustituido por acetato de sodio 50 mM pH 5. Los datos se obtuvieron después de 24 y 48 h, mediante el método del MTT. 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.

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. 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 (Figura 4), con poco o ningún efecto sobre la apoptosis y aumentando la necrosis celular ($p < 0,05$) con respecto al control.

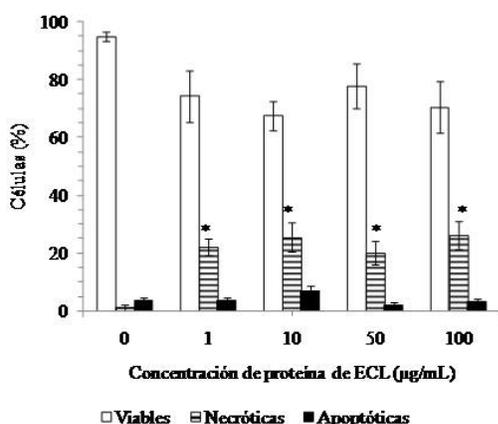


Figura 4

Efecto citotóxico del extracto crudo de látex (ECL) de *Calotropis procera* sobre células Jurkat. Las células (10^6 células/mL) fueron tratadas con las concentraciones indicadas de proteínas laticíferas. Los datos se obtuvieron después de 24 h. En los controles el ECL fue sustituido por acetato de sodio 50 mM pH 5. Se utilizó la técnica de microscopía de fluorescencia con naranja de acridina/bromuro de etidio. 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.

Pedilanthus tithymaloides

a.- Viabilidad y proliferación celular

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 µg/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 µg/mL), observándose un efecto dependiente de la dosis. 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 5) en el cual tanto la viabilidad como la proliferación disminuyen 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 µg/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 µg/mL, respectivamente).

b.- Necrosis y apoptosis celular

Resultados de los experimentos de citotoxicidad utilizando la técnica de exclusión del azul tripano se observan en las Figuras 6 y 7. El efecto fue dependiente de la dosis y significativamente mayor con respecto al control a partir de la dosis de 50 µg/mL.

Los estudios con ECL de *P. tithymaloides* sobre las células Jurkat utilizando la técnica de microscopía de fluorescencia (Figura 8) 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 µg/mL, con la cual el porcentaje de células apoptóticas fue de 30%, lo que representa 9% más alto en comparación con las células necróticas.

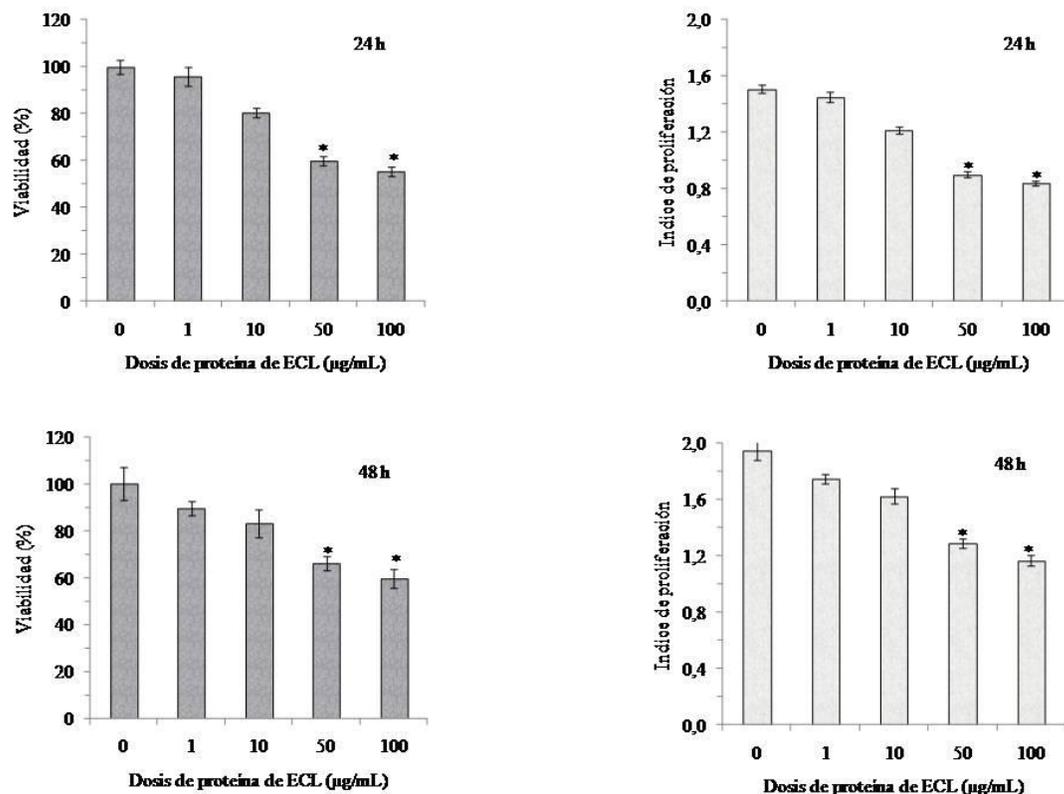


Figura 5

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.

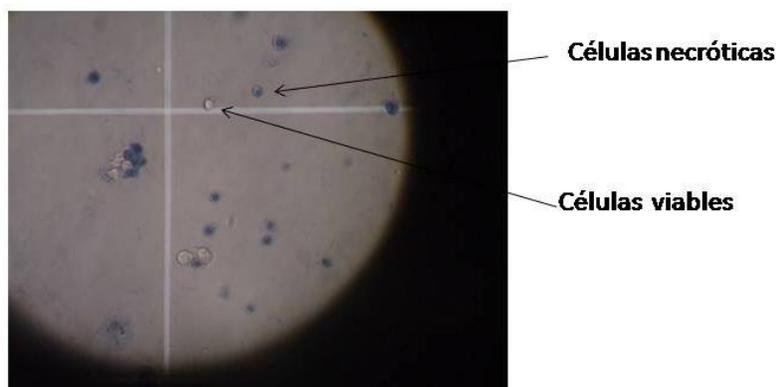


Figura 6

Microfotografía de células Jurkat tratadas con extracto crudo de látex (ECL) de *Pedilanthus tithymaloides*. Las células (10^6 células/mL) fueron tratadas con $200 \mu\text{g/mL}$ de ECL. La imagen fue obtenida después de 24 h con la técnica de exclusión del azul tripano y es representativa de un total de 8 repeticiones con un aumento de 20X.

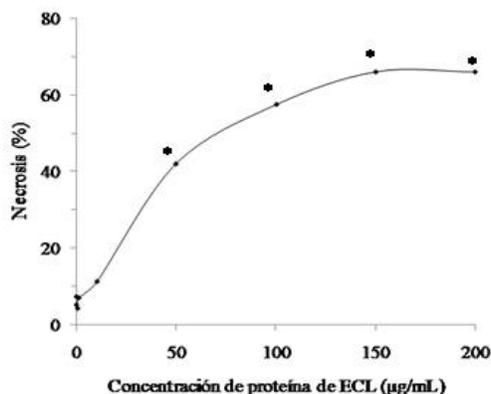


Figura 7

Efecto citotóxico del extracto crudo de látex (ECL) de *Pedilanthus tithymaloides* sobre células Jurkat. Las células (10^6 células/mL) fueron tratadas dosis crecientes de ECL. Los datos se obtuvieron después de 24 horas. Se utilizó la técnica de exclusión del azul tripiano. 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.

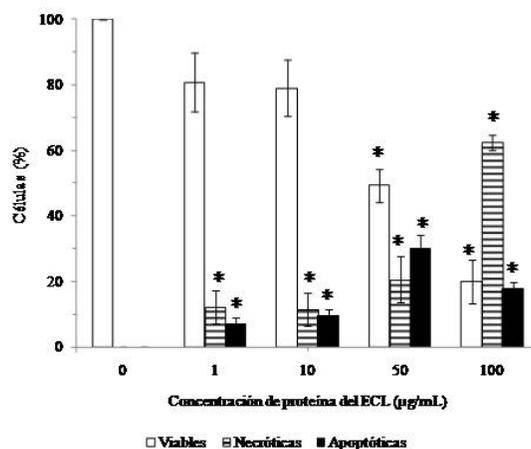


Figura 8

Efecto citotóxico del extracto crudo de látex (ECL) de *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 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.

Efectos citotóxico y citostático de los extractos metanólicos de látex

Calotropis procera

Al evaluar el efecto citotóxico del extracto metanólico de látex (EML) de *C. procera*, se encontró que la viabilidad disminuyó significativamente ($p < 0,05$) a las 24 y 48 horas, con todas las dosis probadas, con respecto al control (Figura 9). A las 48 horas se produjo una inhibición de 15% con la dosis de 1 µg/mL. Asimismo, provocó inhibición de la

proliferación celular con todas las dosis utilizadas y estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0,05$).

Pedilanthus tithymaloides

El EML 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, (Figura 10), sin efectos significativos sobre la proliferación de las células.

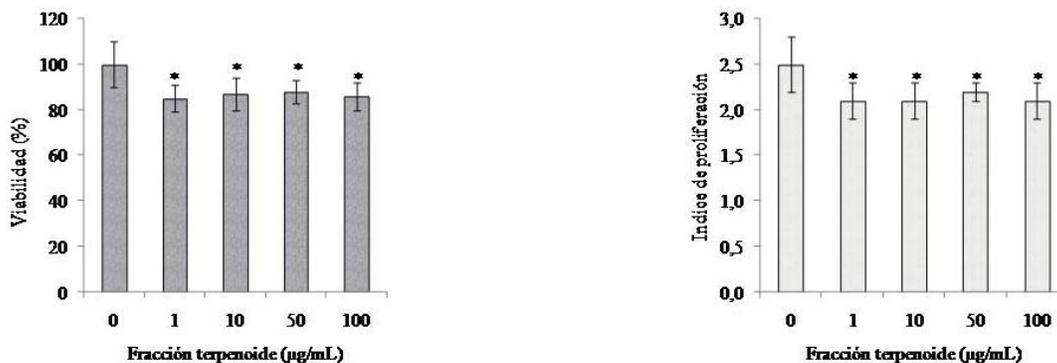


Figura 9

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.

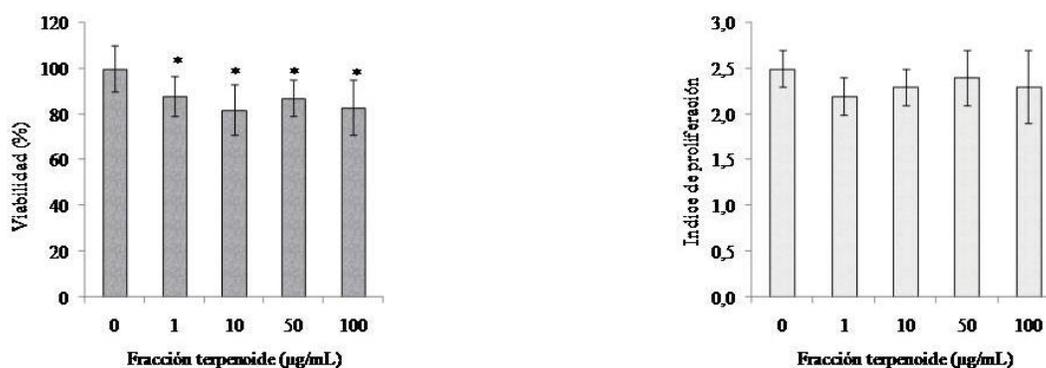


Figura 10

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.

DISCUSIÓN

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 (N), 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*, aunque es conocido que este parámetro es variable y depende de factores agroambientales.

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. Diversos extractos de plantas presentan 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), por ejemplo, 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), asimismo, presentó efectos antiproliferativos *in vitro* en líneas celulares leucémicas K 562, con un IC_{50} de $2,5 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ (Rossi *et al.*, 2003). 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 cancerosas (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 cancerosas (Wang *et al.*, 2008).

El efecto anticanceroso del látex de *C. procera* ha sido previamente publicado, utilizando un modelo de ratón transgénico de carcinoma hepatocelular (Choedon *et al.*, 2006), o sobre diversas líneas de células de cáncer humano como HL-60 (leucemia promielocítica), HCT-8 (colon), MDA-MB-435 (seno) y SF295 (cerebro) (Soares de Oliveira *et al.*, 2007). Estas líneas celulares, tratadas por 72 horas con diferentes concentraciones de proteínas laticíferas obtenidas a partir del látex de *C. procera* produjeron supresión significativa ($p < 0,05$) 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 de Oliveira *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 de Oliveira *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo corroboran la actividad citotóxica y citostática del látex de *C. procera*, esta vez sobre células Jurkat (leucemia de linfocitos T humano), nunca antes reportado. Así mismo, constituye el primer reporte acerca del potencial quimioterapéutico del látex de *P. tithymaloides*.

La actividad metabólica celular disminuyó 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. Con efectos poco marcados al aumentar la dosis. Esto puede 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 potencial para ser utilizada como agente quimioterapéutico.

El ECL de *C. procera* provocó muerte celular por necrosis, contrario a lo reportado por Soares de Oliveira *et al.*, (2007), quienes evaluaron la 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). En *P. tithymaloides*, el ECL presentó un mayor efecto sobre la apoptosis con la dosis de 50 $\mu\text{g/mL}$.

Estudios realizados con diversos extractos laticíferos pueden orientar acerca de la clase de compuesto o molécula que ejerce de forma predominante tales efectos. Por ejemplo, los resultados reportados por Soares de Oliveira *et al.*, (2007) fueron obtenidos de experimentos *in vitro* utilizando extractos acuosos laticíferos parcialmente purificados por cromatografía, atribuyéndose la actividad antineoplásica a una fracción de proteínas laticíferas. Así mismo, se ha demostrado que las proteínas laticíferas pueden disminuir, en un 51,8%, el

crecimiento tumoral *in vivo*, en ratones transplantados con sarcoma 180 (Oliveira *et al.*, 2010). En el presente trabajo, el ECL de las dos especies estudiadas fue evaluado en función de su contenido de proteína, sobre lo cual fueron calculadas las diferentes dosis empleadas en los cultivos *in vitro*, por lo cual las respuestas obtenidas pueden ser atribuidas a efectos provocados por alguna proteína laticífera, o inclusive una combinación de ellas. 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 componentes de naturaleza soluble que podrían estar presentes en el ECL, como proteínas. En este sentido, puede sugerirse la participación de enzimas ribonucleasas (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. 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 ribonucleasa seminal bovina, 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 (Ardelt *et al.*, 2009; Rutkoski y Raines, 2008). Otra evidencia se obtuvo a partir del látex de *Chelidonium majus*, una planta de la familia Papaveraceae ampliamente distribuida 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 desoxirribonucleasa (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). El ECL de ambas especies en estudio contiene enzimas RNAsas, como ha sido demostrado en experimentos realizados en nuestros laboratorios (datos en proceso de publicación).

Por otra parte, se ha encontrado actividad citotóxica de extractos etanólicos de las flores de *C. procera* y del fruto de *Semecarpus anacardium*, provenientes de plantas colectadas en la India y Nepal,

sobre células tumorales COLO 320, con valores de IC₅₀ de 1,4 y 1,6 µg/mL, respectivamente (Smith *et al.*, 1995). Los extractos etanólicos contienen flavonoides, fenoles y esteroides, principalmente (Kamalakkannan *et al.*, 2010). Los esteroides cardenólidos presentes en los extractos etanólicos pueden también presentar actividad antineoplásica, como es el caso del UNBS14502, un cardenólido semisintético perteneciente a la familia de glicósidos esteroides cardíacos, que presentó actividad antileucémica al inducir la muerte celular apoptótica (Juncker *et al.*, 2010).

En el presente estudio fueron evaluados los EML de *C. procera* y *P. tithymaloides*, los cuales contienen alta proporción de di y triterpenos (Ravikant *et al.*, 2002), tal como fue evidenciado al realizar la prueba de Liebermann-Burchard (Kenny, 1952; Mu *et al.*, 2010). 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). En este sentido, se ha reportado que al menos 6 diferentes tipos de diterpenos aislados a partir de *Taiwania cryptomerioides* poseen una potente actividad citotóxica contra células 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 con efecto citotóxico contra líneas celulares de carcinoma humano (HepG2) con valores de IC₅₀ de 8,3 a 16,2 µg/mL (Rasikari *et al.*, 2005). Resultados semejantes fueron obtenidos al evaluar el efecto de diversas concentraciones de un EML 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). 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). De igual forma, un extracto 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, 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.

En el presente estudio, la inhibición del crecimiento celular en todas las dosis de los EML de *C. procera* y *P. tithymaloides*, después de 48 h de incubación, estuvo entre 12 y 18 %, con dosis de 1, 10, 50 y 100 μg/mL, con diferencias significativas con respecto al control, cultivado en ausencia de EML. Resultados semejantes fueron obtenidos en un estudio *in vivo* realizado para conocer la actividad antiproliferativa de diversos extractos de tallo de *C. procera* sobre sarcoma 180 de ratones transplantados, donde se encontró que los extractos metanólicos fueron débilmente citotóxicos (3,2%) mientras que los extractos con etil-acetato y acetona inhibieron el

crecimiento del tumor en un 64,3 y 53,1% respectivamente (Magalhaes *et al.*, 2010).

Una sustancia aislada es considerada promisorio como un compuesto anticáncer cuando el valor de IC₅₀ contra células tumorales es igual o menor a 1 μg/mL (Soares de Oliveira *et al.*, 2007) y un extracto crudo es considerado efectivo cuando su valor de IC₅₀ es ≤ 20 μg/mL (Wong *et al.*, 2011). En el presente estudio, los datos recopilados no permitieron estimar los valores de IC₅₀, por lo cual solo se reportan los resultados en términos de viabilidad y proliferación, no obstante, al comparar las dosis probadas con los porcentajes de inhibición se puede inferir que ninguno de los EML entra en la categoría de sustancia promisorio citotóxica contra las células Jurkat específicamente, lo que no descarta un mejor efecto en otras líneas celulares de cáncer. Mayores estudios se requieren a los fines de elucidar cuales son los compuestos con actividad citotóxica y citostática en el látex de *C. procera* y *P. tithymaloides*.

El presente trabajo constituye el primer reporte acerca del potencial quimioterapéutico del látex de *P. tithymaloides* y aporta nuevos conocimientos al potencial uso del látex de *C. procera*.

CONCLUSIONES

Los látices de *Calotropis procera* y *Pedilanthus tithymaloides* contienen moléculas capaces de provocar efectos citotóxicos y/o citostáticos sobre cultivos *in vitro* de células Jurkat. La inhibición del crecimiento celular en ambas especies estuvo entre 10 y 44% (ECL) y entre 12 y 18% (EML).

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 N° PI-11-6939-2007/2 y la Ayuda Institucional A-11-00-7117-2008.

REFERENCIAS

- Abreu P, Matthew S, González T, Costa D, Segundo M, Fernandes E. 2006. Anti-inflammatory and antioxidant activity of a medicinal tincture from *Pedilanthus tithymaloides*. **Life Sci** 78: 1578 - 1585.
- Ardelt W, Ardelt B, Darzynkiewicz Z. 2009. Ribonucleases as potential modalities in anticancer therapy. **Eur J Pharmacol** 625: 181 - 189.

- Al-Qarawi A, Mahmoud O, Sobaih H, Adam S. 2001. A preliminary study on the antihelmintic activity of *Calotropis procera* latex against *Haemonchus contortus* infection in Najdi sheep. **Vet Res Comm** 25: 61 - 70.
- Bishayee A, Ahmed S, Brankov N, Perloff M. 2011. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. **Front Biosci** 16: 980 - 996.
- Chang CI, Chang JY, Kuo C, Pan W, 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 Medica** 71: 72 - 76.
- Choedon T, Mathan G, Arya S, Kumar VL, Kumar V. 2006. Anticancer and cytotoxic properties of the latex of *Calotropis procera* in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol** 12: 2517 - 2522.
- De Freitas C, Lopes J, Beltramini L, De Oliveira R, Oliveira J, Ramos, M. 2011. Osmotin from *Calotropis procera* latex: new insights into structure and antifungal properties. **Biochim Biophys Acta** 1808: 2501 - 2507.
- Dewan S, Sangraula H, Kumar V. 2000. Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. **J Ethnopharmacol** 73: 307 - 311.
- Freitas CD, Soares J, Miranda MR, Macedo NM, Pereira Sales M, Villas-Boas L, Viana Ramos M. 2007. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiol Biochem** 45: 781 - 789.
- Hathaway W, Newby L, 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.
- Juncker T, Cerella C, Teiten MH, Morceau F, Schumacher M, Ghelfi J, Schnekenburger M, Henry E, Dicato M, Diederich M. 2011. UNBS1450; a steroid cardiac glycoside inducing apoptotic cell death in human leukemia cells. **Biochem Pharmacol** 81: 13 - 23.
- Kamalakkannan S, Madhiyazhagan P, Dhandapani A, Murugan K, Barnard D. 2010. *Pedilanthus tithymaloides* (Euphorbiaceae) leaf extract phytochemicals: toxicity to the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Vector-Borne Zoonot** 10: 817 - 820.
- Kenny A. 1952. The determination of cholesterol by the Liebermann-Burchard reaction. **Biochem J** 52: 611 - 619.
- Kim E, Suh K, Kim D, Jung E, Seo C, Son J, Woo M, McLaughlin J. 2005. Asimitrin and 4-hydroxytrilobin, new bioactive annonaceous acetogenins from the seed of *Asimina triloba* possessing a bis-tetrahydrofuran ring. **J Nat Prod** 68: 194 - 197.
- Kumar S, Dewan S, Sangraula H, Kumar VL. 2001. Anti-diarrhoeal activity of the látex of *Calotropis procera*. **J Ethnopharmacol** 76: 115 - 118.
- Kumar V, Basu N. 1994. Anti-inflammatory activity of the látex of *Calotropis procera*. **J Ethnopharmacol** 44: 123 - 125.
- Kumar V, Roy S. 2007. *Calotropis procera* latex extract affords protection against inflammation and oxidative stress in Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis in rats. **Mediators Inflamm** ID 47523. doi:10.1155/2007/47523.
- Kumar VL, Shivkar YM. 2004. Involvement of prostaglandins in inflammation induced by latex of *Calotropis procera*. **Mediators Inflamm** 13: 151 - 155.
- Kummalu T. 2005. Molecular mechanism of herbs in human lung cancer cells. **J Med Assoc Thailand** 88: 1725 - 1734.
- Larhsini M, Oumoulid L, Lazrek H, Wataleb S, Bousaid M, Bekkouche M, Markouk M, Jana M. 1999. Screening of antibacterial and anti parasitic activity of six Moroccan medicinal plants. **Therapie** 54: 763 - 765.
- 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 OH, Rosebrough NJ, Farr L, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem** 193: 265 - 275.
- Magalhães HI, Ferreira PM, Moura ES, Torres MR, Alves AP, Pessoa OD, Costa-Lotufo LV, Moraes MO, Pessoa C. 2010. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative activity of *Calotropis procera* stem extracts. **An Acad Bras Cienc** 82: 407 - 416.
- Mahmoud OM, Haroun E, Sobaih M, Omer O, Adam S. 2001. Comparative efficacy of *Calotropis procera* latex and sulfadimidine against experimentally-induced *Eimeria ovinoidales*

- infection in Najdi lambs. **Small Ruminants Res** 42: 135 - 140.
- Markouk M, Bekkouche K, Larhsini M, Bousaid M, Lazrek H, Jana M. 2000. Evaluation of some Moroccan medicinal plants extracts for larvicidal activity. **J Ethnopharmacol** 73: 293 - 297.
- Mascolo N, Sharma R, Jain SC, Calpasso F. 1988. Ethnopharmacology of *Calotropis procera* flowers. **J Ethnopharmacol** 22: 211 - 221.
- Matsuda H, Nakashima S, Abdel-Halim O, Morikawa T, 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. **Chem Pharm Bull** 58: 747 - 751.
- Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacol Rev** 52: 673 - 751.
- Moreno RM, Ferreira M, Goncalves P, Capparelli Mattoso LH. 2005. Technological properties of latex and natural rubber of *Hevea brasiliensis* clones. **Cienc Agríc** 62: 122 - 126.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods** 65: 55 - 63.
- Moursy LE. 1997. Insecticidal activity of *Calotropis procera* extract on the Flesfly, *Sarcophaga haemorrhoidalis* fallen. **J Egypt Soc Parasitol** 2: 505 - 514.
- Mu LH, Gong QQ, Zhao HX, Liu P. 2010. Triterpenoid saponins from *Ardisia gigantifolia*. **Chem Pharm Bull** 58: 1248 - 1251.
- Murti Y, Yogi B, Pathak D. 2013. Pharmacognostic standardization of leaves of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (Asclepiadaceae). **Int J Ayurveda Res** 1: 14 - 17.
- Nawrot R, Wolun-Cholewa M, Gozdicka-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 Cyto** 46: 79 - 83.
- Oliveira RS, Figueiredo IS, Freitas LB, Pinheiro RS, Brito GA, Alencar NM, Ramos MV, Ralph MT, Lima-Filho JV. 2012. Inflammation induced by phytochemicals from the latex of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) protects against Salmonella infection in a murine model of typhoid fever. **Inflamm Res** 61: 689 - 698.
- Organización Mundial de la Salud. 2012. Datos y estadísticas. <http://www.who.int/es> [Consultada: 15 Mayo 2012].
- Padhy BM, Kumar VL. 2005. Inhibition of *Calotropis procera* latex-Induced Inflammatory Hyperalgesia by Oxytocin and Melatonin. **Mediators Inflamm** 6: 360 - 365.
- Ram V, Kumari S. 2001. Natural products of plant origin as anticancer agents. **Drug News Perspec** 14: 465 - 482.
- Rahmatullah M, Sultan S, Toma TT, Lucky S, Chowdhury M, Haque WM, Annay EA, Jahan R. 2010. Effect of *cuscuta reflexa* stem and *calotropis procera* leaf extracts on glucose tolerance in glucose-induced hyperglycemic rats and mice. **Afr J Trad Complement Altern Med** 7: 109 - 112.
- Rasikari HL, Leach DN, Waterman PG, Spooner-Hart RN, Basta AH, Banbury LK, Winter KM, Forster PI. 2005. Cytotoxic clerodane diterpenes from *Glossocarya calcicola*. **Phytochemistry** 66: 2844 - 2850.
- Rathod NR, Chitme HR, Irchhaiya R, Chandra R. 2011. Hypoglycemic effect of *Calotropis gigantea* Linn. leaves and flowers in streptozotocin-induced diabetic rats. **Oman Med J** 26: 104 - 108.
- Ravikanth V, Niranjan Reddy VL, Prabhakar Rao T, Diwan PV, Ramakrishna S, Venkateswarlu Y. 2002. Macrocyclic diterpenes from *Euphorbia nivulia*. **Phytochemistry** 59: 331 - 335.
- Renvoize C, Biola A, Pallardy M, Breard J. 1998. Apoptosis: identification of dying cells. **Cell Biol Toxicol** 14: 111 - 120.
- 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.
- Roy S, Sehgal R, Padhy BM, Kumar VL. 2005. Antioxidant and protective effect of latex of *Calotropis procera* against alloxan-induced

- diabetes in rats. **J Ethnopharmacol** 102: 470 - 473.
- Rutkoski T, Raines R. 2008. Evasion of ribonuclease inhibitor as a determinant of ribonuclease cytotoxicity. **Curr Pharm Biotech** 9: 185 - 216.
- Samy RP, Chow VTK. 2012. Pilot study with regard to the wound healing activity of protein from *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Evid Based Complement Alternat Med** doi:10.1155/2012/294528
- Samy RP, Rajendran P, Li F, Anandi NM, Stiles BG, Ignacimuthu S, Sethi G, Chow VTK. 2012. Identification of a novel *Calotropis procera* protein that can suppress tumor growth in breast cancer through the suppression of NF- κ B pathway. **Plos One** 7: e48514. doi:10.1371/journal.pone.0048514.
- Sanchez E, Pérez A, Chávez D, Hechevarría I. 2005. Caracterización farmacognóstica de *Pedilanthus tithymaloides* L. *Poit.* **Rev Cub Plant Med** http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962005000100004&lng=es&nrm=iso [Consultada: 16 Febrero 2012].
- Sehgal R, Roy S, Kumar VL. 2006. Evaluation of cytotoxic potential of látex of *Calotropis procera* and Podophyllotoxin in *Allum cepa* root model. **Biocell** 30: 9 - 13.
- Sharma P, Sharma JD. 1999. Evaluation of *in vitro* schizontocidal activity of plant parts of *Calotropis procera*-an ethanobotanical approach. **J Ethnopharmacol** 68: 83 - 95.
- Sharma P, Sharma JD. 2001. In vitro hydrolysis of erythrocytes by plant extracts with anti plasmodial activity. **J Ethnopharmacol** 74: 239 - 243.
- Smith H, Woerdenbag H, Singh R, Meulenbeld G, Labadie R, Zwaving J. 1995. Ayurvedic herbal drug with possible cytostatic activity. **J Ethnopharmacol** 47: 75 - 84.
- Soares de Oliveira J, Pereira Bezerra D, Teixeira de Freitas CD, Barreto Marinho Filho JD, de Moraes MO, Pessoa C, Veras Costa-Lotufo L, Viana Ramos 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.
- Thao N, Hung T, Lee M, Kim J, Min B, Bae K. 2010. Triterpenoids from *Camellia japonica* and their cytotoxic activity. **Chem Pharm Bull** 58: 121 - 124.
- Tseng M, 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 Res** 43: 5910 - 5914.
- van Der Heijden R, Jacob D, Snoeijer W, Hallard D, Verpoorte R. 2004. The Catharanthus alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. **Curr Med Chem** 11: 607 - 628.
- Velasco A, Lorenzo P, Serrano J, Andres-Trelles F. 1993. **Velazquez. Farmacología**. 16^a Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. España.
- Vidotti G, Zimmermann A, Sarragiotto M, Nakamura C, Días B. 2006. Antimicrobial and phytochemical studies on *Pedilanthus tithymaloides*. **Fitoterapia** 77: 43 - 46.
- 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 latex against human cancer cells. **Food Chem Toxicol** 46: 1025 - 1033.
- Wong SK, Lim YY, Abdullah NR, Nordin FJ. 2011. Antiproliferative and phytochemical analyses of leaf extracts of ten Apocynaceae species. **Pharmacogn Res** 3: 100 - 106.