

Análisis multivariado de las proteasas de la familia Asclepiadaceae

Constanza Liggieri^{1a*}, Marina L Sardi², David Obregón^{1b}, Susana Morcelle del Valle^{1c}
y Nora Priolo¹

¹ Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE), Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. C.C. 711, (B1900AVW), La Plata, República Argentina.

² División Antropología. Museo de La Plata, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, República Argentina.

^a Miembro de la Carrera de Profesional de Apoyo de la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC).

^b Becario del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Conicet).

^c Miembro de la Carrera del Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Conicet).

* Autor a quien dirigir correspondencia: cliggieri@biol.unlp.edu.ar.

Resumen

Varias especies de las familias *Asclepiadaceae* y *Apocynaceae* son de especial interés debido a que son utilizadas como plantas medicinales porque tienen diferentes principios activos. En este trabajo se discute la posición taxonómica de la familia *Asclepiadaceae* mediante un análisis multivariado de caracteres bioquímicos. El objetivo de la investigación fue establecer si la familia *Asclepiadaceae* es taxonómicamente una familia independiente, o es una subfamilia de la familia *Apocynaceae*.

La muestra utilizada estaba conformada por proteasas de látex de: *Araujia hortorum*, *A. angustifolia*, *Asclepias curassavica*, *A. fruticosa*, *Funastrum claussum*, *Morrenia brachystephana*, *M. odorata*, *Philibertia gilliesii* (*Asclepiadaceae*) y *Ervatamia coronaria*, *E. heyneana* (*Apocynaceae*). Se realizó un agrupamiento jerárquico de esas enzimas para determinar si las proteasas pertenecientes a la familia *Asclepiadaceae* conforman un grupo separado respecto a las proteasas provenientes de la familia *Apocynaceae*.

Los resultados obtenidos indicaron que los caracteres bioquímicos empleados en este trabajo no permitieron establecer si la familia *Asclepiadaceae* es una familia independiente o no, de la familia *Apocynaceae*; así, concuerda con la corriente cladista que considera a las Asclepiadáceas como una subfamilia (*Asclepiadoideae*) dentro de la familia *Apocynaceae*.

Multivariate analysis from proteases of Asclepiadaceae family

Summary

Several species of the *Asclepiadaceae* and *Apocynaceae* families, are of great interest due to their uses in folk medicine and their different active compounds. In this paper, by means of a multivariate analysis of biochemical characters the taxonomic placement of *Asclepiadaceae* is discussed. The aim is to investigate whether the *Asclepiadaceae* must be systematically considered as an independent family, or to be recognized as a subfamily of *Apocynaceae*. The sample was comprised by proteases of *Araujia hortorum*, *A. angustifolia*, *Asclepias curassavica*, *A. fruticosa*, *Funastrum claussum*, *Morrenia brachystephana*, *M. odorata*, *Philibertia gilliesii* (*Asclepiadaceae*) and *Ervatamia coronaria*, *E. heyneana* (*Apocynaceae*). A hierarchical cluster was

Palabras clave: *Asclepiadaceae* - *Apocynaceae* - proteasas - feneticismo.

Key words: *Asclepiadaceae* - *Apocynaceae* - proteases - phenetics.

obtained with the biochemical characters of proteases, in order to determine whether proteases derived from *Asclepiadaceae* cluster as a separate group respect to proteases derived from *Apocynaceae*. Results indicated that proteases of both *Asclepiadaceae* and *Apocynaceae* cluster together. These data agree with cladistic hypothesis that considerer the *Asclepiadaceae* as a subfamily of the *Apocynaceae*.

Introducción

El interés que promueve el estudio de las familias *Asclepiadaceae* y *Apocynaceae* se debe a que varias especies son utilizadas como plantas medicinales porque tienen diferentes principios activos. Algunas de las especies usadas con estos fines (*Vinca minor*, *Catharanthus roseus*, *Rauwolfia serpentina*, *Nerium oleander*) contienen alcaloides, flavonoides, taninos y glicósidos cardíacos (cardenólidos).

Las principales propiedades medicinales que se atribuyen a estas especies son analgésicas, dermatológicas, purgantes, antitumorales, hipotensoras y sedantes (Hechem de Bonansea y Escurra, 2006; Fernández Brewer y col., 2008).

Es necesario identificar con precisión las especies pertenecientes a estas familias, debido a la importancia económica que tienen algunas de ellas; por ejemplo, la vinca de Madagascar (*Catharanthus roseus*, perteneciente a la familia *Apocynaceae*) se ha convertido en la principal fuente de alcaloides como la vinblastina (antineoplásico), ajmalicina (hipotensor) y serpentina (tranquilizante) (Iwase y col., 2005). Otras especies, como *Nerium oleander* (*Apocynaceae*) o *Asclepias syriaca* (*Asclepiadaceae*), son conocidas por su toxicidad.

Uno de los principales objetivos de la Sistemática Botánica es la construcción de un verdadero sistema filogenético que refleje las relaciones naturales entre todos los taxones vegetales. No es, naturalmente, una tarea fácil debido a que desde mediados del siglo XX se han producido diferentes tipos de clasificaciones para las Angiospermas. Ejemplo de ello son las elaboradas por Hutchinson (1959; 1973); Takhtajan (1959; 1969; 1980); Cronquist (1968; 1981), Dahlgren (1980) y Thorne (1983; 1992).

Los fundamentos de la clasificación biológica son objeto de una de las más intensas controversias en la Biología, ya que hay varias corrientes de pensamiento acerca de los fundamentos teóricos para aplicar en esa clasificación. Es así que se construyeron variadas clasificaciones, desde la corriente evolucionista (Schumann, 1985; Bruyns y Forster, 1991; Wenzel, 1997); la cladista (Endress y Bruyns, 2000;

Sennblad y Bremer, 2002), y la fenética (Sneath y Sokal, 1973; Duncan y Baum, 1981).

Los caracteres morfológicos, anatómicos, palinológicos, embriológicos, químicos, bioquímicos, entre otros, son válidos para evaluar las relaciones naturales entre los diferentes seres vivos cuando no se cuenta con sus registros fósiles.

La publicación *Chemotaxonomie der Pflanzen* por Hegnauer fue un hito en la comprensión de las relaciones filogenéticas de las familias vegetales. Este autor revisó la literatura sobre la distribución de los metabolitos secundarios y de algunos metabolitos primarios en el reino vegetal –como el almacenamiento de carbohidratos– y sugirió la existencia de relaciones filogenéticas entre las familias de plantas a partir de sus perfiles químicos (*Chemotaxonomische Betrachtungen*) (Hegnauer, 1962).

En forma simultánea se desarrollaron la “quimiotaxonomía” o “sistemática micromolecular” –que tradicionalmente utiliza como caracteres taxonómicos pequeños componentes orgánicos de plantas–, y la “sistemática macromolecular” o “sistemática molecular” –que emplea las características de las biomoléculas– (proteínas y ácidos nucleicos) en sus clasificaciones (Grayer y col., 1999).

Actualmente los investigadores de diferentes disciplinas se proponen llegar a un acuerdo definitivo con respecto a la ubicación taxonómica de la familia *Asclepiadaceae*.

Tradicionalmente la posición de esta familia es la siguiente:

- Reino, Plantae
- División, Magnoliophyta
- Clase, Magnoliopsida
- Subclase, Asteridae
- Orden, Gentianales
- Familia, *Asclepiadaceae*.

El orden Gentianales tiene, además de la ya mencionada familia *Asclepiadaceae*, cuatro familias más: *Loganiaceae*, *Gentianaceae*, *Saccifoliaceae* y *Apocynaceae*. La controversia se plantea cuando se considera la familia *Asclepiadaceae* como una subfamilia de la familia *Apocynaceae*, o mantenerla como tal.

La escuela evolucionista o tradicional considera que tanto la familia *Asclepiadaceae* como la familia *Apocynaceae* tienen características propias, y por ello mantienen la identidad de cada una de ellas. Con relación a esta temática han trabajado Cronquist (1981), Swarupanandan y col. (1996), entre otros. Cronquist mantiene las dos familias independientes por la presencia de traslatores (estructuras que participan en la polinización) en *Asclepiadaceae* y su ausencia en *Apocynaceae*.

Autores como Safwat (1962), Stevens (1983), Fishbein (2001), Liede y Tauber (2002) y Endress y Bruyns (2000), entre otros, siguen la línea de pensamiento cladista en lo que se refiere a la ubicación de la familia *Asclepiadaceae*. Endress y sus colaboradores consideran que los integrantes de la familia *Asclepiadaceae* son derivados apomórficos de los miembros de la familia *Apocynaceae*.

Sin embargo, las nuevas investigaciones moleculares, así como los anteriores estudios morfológicos, sugieren la inclusión de la familia *Asclepiadaceae* como una subfamilia de la familia *Apocynaceae* (Sennblad y Bremer, 1996).

En este estudio se propone contribuir a este debate aplicando la metodología de la escuela fenética; así, analiza las variables bioquímicas de las proteasas de ambas familias, *Asclepiadaceae* y *Apocynaceae*, por técnicas de análisis multivariado. El objetivo principal

consiste en clarificar si la familia *Asclepiadaceae* es una familia taxonómicamente independiente o es una subfamilia de la familia *Apocynaceae*. La hipótesis de prueba indica que *Asclepiadaceae* es una familia independiente con respecto a la familia *Apocynaceae*, y si esto se expresa por rasgos bioquímicos, entonces las proteasas de la familia *Asclepiadaceae* deberían formar un grupo bien definido y no deberían estar vinculadas con las proteasas de la familia *Apocynaceae*.

Materiales y Métodos

Material vegetal

La muestra estuvo conformada por 19 proteasas, de las cuales 15 pertenecen a la familia *Asclepiadaceae* y el resto, a la familia *Apocynaceae*, según la clasificación tradicional de Cronquist (1981). En el primer grupo las enzimas derivan de las siguientes especies: *Araujia angustifolia*, *Araujia hortorum*, *Asclepias curassavica*, *Asclepias fruticosa*, *Funastrum claussum*, *Morrenia brachystephana*, *Morrenia odorata* y *Philibertia gilliesii* (Tabla 1). Las cuatro proteasas restantes de la muestra derivan de la familia *Apocynaceae* y pertenecen a las especies: *Ervatamia coronaria* y *Ervatamia heyneana* (Tabla 2).

Tabla 1.- Proteasas seleccionadas de la familia *Asclepiadaceae*

Proteasas	Familia <i>Asclepiadaceae</i>	Referencias
Araujiaína a I (Arau a I)		
Araujiaína a II (Arau a II)	<i>Araujia angustifolia</i> (Hook et Arn.) Descaine	Obregón y col., 2008
Araujiaína a III (Arau a III)		
Araujiaína h I (Arau h I)		
Araujiaína h II (Arau h III)	<i>Araujia hortorum</i> Fourn.	Obregón y col., 2001
Araujiaína h III (Arau h III)		
Asclepaína c I (Ascle c I)		
Asclepaína c II (Ascle c II)	<i>Asclepias curassavica</i> L.	Liggieri y col., 2004
Asclepaína f (Ascle f)	<i>Asclepias fruticosa</i> L.	Trejo y col., 2001
Funastraína c II (Funa c II)	<i>Funastrum claussum</i> (Jacq.) Schlechter	Morcelle de Valle y col., 2004
Morrenaína b I (Morre b I)		
Morrenaína b II (Morre b II)	<i>Morrenia brachystephana</i> Griseb.	Vairo Cavalli y col., 2003 Cortadi, 2001
Morrenaína o I (Morre o I)		
Morrenaína o II (Morre o II)	<i>Morrenia odorata</i> (Hook et Arn.) Lindley	Vairo Cavalli y col., 2001 Cortadi, 2001
Philebertaína g I (Phili g I)	<i>Philibertia gilliesii</i> Hook. et Arn.	Sequeiros y col., 2005

Tabla 2.- Proteasas seleccionadas de la familia *Apocynaceae*

Proteasas	Familia <i>Apocynaceae</i>	Referencias
Ervatamina A (Ervata A)	<i>Ervatamia coronaria</i> (Jacq.) Stapf.	Sreedevi y col., 2003
Ervatamina B (Ervata B)	<i>Ervatamia coronaria</i> (Jacq.) Stapf.	Kundu y col., 2000
Ervatamina C (Ervata C)	<i>Ervatamia coronaria</i> (Jacq.) Stapf.	Kundu y col., 1999
Heynaína (Heyna)	<i>Ervatamia heyneana</i> (Wall.) Cooke	Patel y col., 2003

Tabla 3.- Caracteres bioquímicos de las proteasas seleccionadas

Fitoproteasas	Caracteres bioquímicos						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Araujiaína a I (Arau a I)	4,88	23,464	9,3	8,00	NC	NC	85
Araujiaína a II (Arau a II)	8,6	23,528	9,3	8,25	0,18	NC	0
Araujiaína a III (Arau a III)	8,66	23,488	9,3	9,25	5,14	NC	80
Araujiaína h I (Arau h I)	18	24,031	9,3	8,75	NC	0,024	0
Araujiaína h II (Arau h II)	3	23,718	8,9	8,5	NC	0,238	85
Araujiaína h III (Arau h III)	12,5	23,446	10,5	8,5	NC	0,099	80
Asclepaína c I (Ascle c I)	10,9	23,200	9,3	8,5	0,8183	0,0503	80
Asclepaína cII (Ascle cII)	6,58	23,590	9,3	8,5	NC	0,1634	85
Asclepaína f (Ascle f)	7	23,652	9,3	9,5	0,0554	NC	85
Funstraína c II (Funa c II)	7,45	23,636	9,3	9,5	0,1011	0,0203	80
Morrenaína b I (Morre b I)	10,9	23,205	9,3	8,70	NC	0,02	0
Morrenaína b II (Morre b II)	8,8	26,000	9,3	8,25	NC	0,041	0
Morrenaína o I (Morre o I)	15,36	27,000	9,3	8,5	NC	NC	0
Morrenaína o II (Morre o II)	30,1	25,8	9,3	8,5	NC	0,000043	0
Philibertaína g I (Phili g I)	5,28	23,530	9,0	7,5	0,1527	NC	0

Referencias. Caracteres bioquímicos. **I:** Actividad específica (Ucas/mg de proteína); **II:** Peso Molecular (Daltons); **III:** Punto isoeléctrico; **IV:** pH óptimo; **V:** Parámetro cinético K_m usando $pFLNA$ como sustrato; **VI:** Parámetro cinético K_m usando N -a-Cbz-L-Gln p -Nitrofenil ésteres de algunos L-aminoácidos (Ala, Asn, Gln, Gly, Ile, Leu, Trp, Pro y Val) como sustratos; **VII:** Porcentaje de identidad con papaína (Papaya Proteinasa I); NC: datos no comparados.

Selección de los caracteres

Se utilizaron siete características bioquímicas para comparar las proteasas entre sí. (Tabla 3): actividad específica (Ucas/mg de proteína), peso molecular (Daltons), punto isoeléctrico, pH óptimo, parámetro cinético K_m usando como sustratos $pFLNA$ y N -a-Cbz-L- p -Nitrofenil ésteres de algunos L-aminoácidos (Ala, Asn, Gln, Gly, Ile, Leu, Trp, Pro y Val), y porcentaje de identidad con papaína (Papaya Proteinasa I).

Método estadístico

Las relaciones entre las proteasas se evaluaron por medio de una agrupación jerárquica, técnica de uso

común para analizar similitudes y diferencias entre las unidades por la aplicación de una serie de algoritmos. La agrupación jerárquica permite organizar unidades en estructuras significativas (Sneath y Sokal, 1973).

Se efectuó una estandarización de los datos con el objeto de eliminar las diferencias de escala y de unidades de medida entre las variables. Los datos fueron convertidos en Score Z (unidades estándar en valor promedio igual a 0 y desvío estándar igual a 1) (Crisci y López Armengol, 1983). La agrupación se basó en el Método de la Varianza Mínima de Ward y la distancia euclidiana (Johnson, 2000).

En primer lugar, las proteasas de la familia *Asclepiadaceae* se compararon entre sí con el objeto de conocer la forma en que se agrupaban en

función de sus similitudes y diferencias. Luego se incluyeron en la comparación las proteasas de la familia *Apocynaceae* con el fin de detectar los patrones de relación con las proteasas de la familia *Asclepiadaceae*. Debido a la falta de datos en algunas de las características, la comparación entre *Asclepiadaceae* y *Apocynaceae* se realizó con las variables 1-4 y 7. Los análisis estadísticos se realizaron con Systat 10,2.

Resultados

La comparación de las proteasas de la familia *Asclepiadaceae* con todas las variables estudiadas origina la formación de dos grupos principales (Figura 1), donde el grupo más distanciado está integrado por tres Morrenáinas (Morre b II, Morre o I y Morre o II), mientras que el otro grupo se subdivide en dos subgrupos: uno de ellos compuesto por Arau h II, Ascle c II, Ascle f, Funa c II y Arau h III, y el otro subgrupo, integrado por: Arau h I, Morre b I, Arau a II, Phili g I, Arau a I, Ascle c I y Arau III.

Al incluir en el análisis estadístico las proteasas de la familia *Apocynaceae* se formaron dos grandes agrupamientos (Figura 2). El grupo más alejado contiene a Ascle f, Funa c II, Arau a III, Ascle c I, Ascle c II, Arau a I, Arau h II y *Ervata C*. El grupo restante fue subdividido en dos subgrupos: el formado por Heyna, Arau h III, Arau h I, Morre b I, Arau a II y Phili g I y el integrado por *Ervata B*, Morre b II, Morre o I, Morre o II y *Ervata A*.

Discusión

Del análisis de los datos expuestos, surgieron resultados sorprendentes. Por un lado se mantuvo la relación de las proteasas de la familia *Asclepiadaceae* entre sí y, por otro, las proteasas correspondientes a la familia *Apocynaceae* se distribuyeron en los dos grupos principales.

La clasificación resultante desde el punto de vista de la fenética sugirió que la familia *Asclepiadaceae* no puede considerarse una familia separada. Estos resultados coincidieron con el pensamiento cladístico y, en consecuencia, difirieron con el evolucionista.

Tanto la escuela cladista como la evolucionista con-

Figura 1.- Fenograma correspondiente a las características bioquímicas de las proteasas de la familia *Asclepiadaceae*

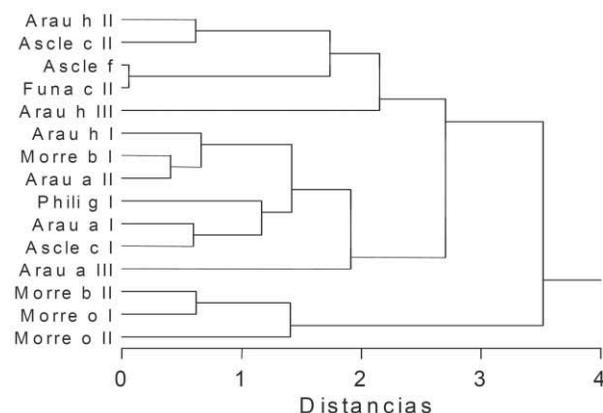
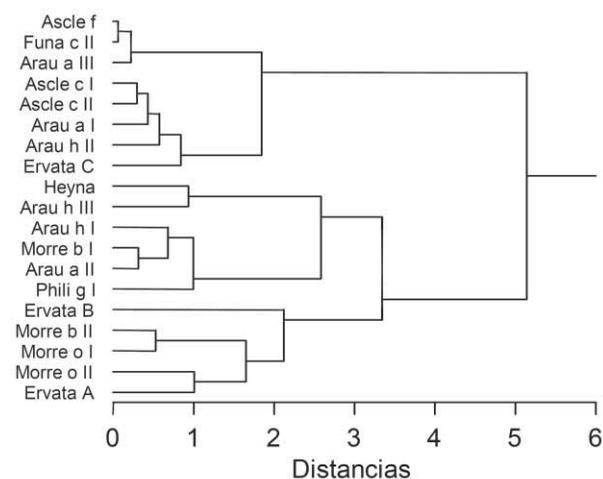


Figura 2.- Fenograma correspondiente a las características bioquímicas de las proteasas de las familias *Asclepiadaceae* y *Apocynaceae*



sidera que las relaciones filogenéticas deben expresarse en la clasificación. El evolucionismo también establece que la clasificación debe expresar la cantidad de cambio entre los taxones y, además, que tengan un sentido práctico y estable. El cladismo no considera las relaciones basadas en la similitud global de los caracteres en sus clasificaciones. Esta escuela argumenta que si dos grupos son similares no necesariamente significa que sus relaciones evolutivas sean cercanas. Estas semejanzas pueden ser debidas a la congruencia evolutiva. Es decir, esa congruencia se refiere al proceso por el cual los caracteres de especies pertenecientes a líneas evolutivas independientes pueden tener

semejanzas en respuesta a las adaptaciones que surgen de similares presiones de selección (Queiroz y Gauthieri, 1992; Cantino, 1998).

Finalmente, esta corriente tiende a crear un gran número de categorías taxonómicas, una por cada nodo de un cladograma, lo que lleva a un exceso de categorías jerárquicas. De este modo, cada cladograma representa una hipótesis evolutiva global que la convierte en algo extremadamente cambiante debido a que nuevos estudios pueden llevar a una nueva clasificación taxonómica, con cambios jerárquicos notables. Por lo tanto, las clasificaciones cladistas no son estables como la de los taxónomos evolucionistas, pues hay un continuo cambio de categorías taxonómicas, lo cual estaría agravando aún más la taxonomía de los seres vivos.

Por su lado, el feneticismo, proporciona clasificaciones que consideran varios caracteres del organismo en su conjunto, y cada uno tiene el mismo peso en la clasificación.

Las diferencias entre las distintas corrientes de pensamiento son las responsables de las diferencias en las clasificaciones biológicas. Es por ello que en la actualidad, se tiende a la búsqueda de nuevos caracteres que permitan acceder a nuevas fuentes de información filogenética. Así, los datos provenientes de estudios de secuenciación de ADN, los estudios ontogenéticos basados en un contexto filogenético con el objeto de evitar errores en los conceptos de estructuras homólogas, entre otros, cambiarían la idea que se tiene sobre la evolución puntual de algunos grupos de organismos.

Además, los análisis morfológicos y moleculares constituyen las dos caras de una misma moneda y deben utilizarse de manera complementaria (Stuessy, 1997; Fishbein, 2001).

Se puede concluir que, de acuerdo con el análisis multivariado de caracteres bioquímicos realizados en este estudio, la hipótesis fue rechazada. Las proteasas de la familia *Asclepiadaceae* no conforman un grupo separado respecto a las correspondientes a la familia *Apocynaceae*. Así, los caracteres bioquímicos empleados en este trabajo no permitieron establecer la independencia taxonómica de una familia con respecto a la otra. De este modo, entendemos que este trabajo constituye un aporte a la corriente cladista que considera que las *Asclepiadáceas* forman la subfamilia *Asclepiadoideae* dentro de la familia *Apocynaceae*.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con el apoyo de ANPCyT (PICT 9-9916), Conicet (PIP 2813); la Universidad Nacional de La Plata, Argentina y CYTED IV.22.

Referencias bibliográficas

- Bruyns, P.V. and Forster, P.I. (1991). "Recircumscription of the Stapelieae". *Taxon* 40: 381-391.
- Cantino, P.D. (1998). "Binomials, Hyphenated uninomials and phylogenetic nomenclature". *Taxon* 47: 425-429.
- Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press, New York. pp.:1262.
- Duncan, T. and Baum, B.R. (1981). "Numerical Phenetics: Its use in botanical systematics". *Annual Review of Ecology and Systematics* 12: 387-404.
- Endress, M.E. and Bruyns, P.V. (2000). "A revised Classification of the *Apocynaceae* s.l.". *Bot. Rev.* 66(1): 1-56.
- Fernández Brewer, A.M.; Juárez Jaimes, V. y Cortés Zárraga, L. (2008). "Usos de las especies del género *Asclepias* L. (*Apocynaceae*, *Asclepiadoidea*). Información del Herbario Nacional de México, Mexu". *Polibotánica* 25: 155-171.
- Fishbein, M. (2001). "Evolutionary innovation and diversification in the flowers of *Asclepiadaceae*". *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88: 603-623.
- Grayer, R.J.; Chase M.W. and Simmonds M.S.J. (1999). "A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: An appreciation of Hegnauer's "Chemotaxonomie der Pflanzen". *Biochemical Systematics and Ecology* 27(4): 369-393.
- Hechem de Bonansea, M.V. and Ecurra, C. (2006). "*Asclepiadaceae* R. BR". *Serie Flora* 6(4): 1-64.
- Iwase, A.; Aoyagi, H.; Ohme-Takagi, M. and Tanaka, H. (2005). "Development of a novel system for producing ajmalicine and serpentine using direct culture of leaves in *Catharanthus roseus* intact plant". *J. Biosci. Bioeng.* 99: 208-215.
- Johnson, D.E. (2000). *Métodos Multivariados*

- Aplicados al Análisis de Datos*. International Thomson Editores.
- Kundu, S.; Sundd, M. and Jagannadham, M.V. (1999). "Structural characterization of a highly stable cysteine protease ervatamin C". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264(3): 635-42.
- Kundu, S.; Sundd, M. and Jagannadham, M.V. (2000). "Purification and characterization of a stable cysteine protease ervatamin B, with two disulfide bridges, from the latex of *Ervatamia coronaria*". *J. Agric. Food. Chem.* 48(2): 171-9.
- Liede, S. and Tauber, A. (2002). "Circumscription of genus *Cynanchum* (*Apocynaceae-Asclepiadoidea*)". *Sys. Bot.* 27: 789-800.
- Liggieri, C.; Arribére, M. C.; Trejo, S.A.; Canals, F.; Avilés, F. and Priolo, N. (2004). "Purification and biochemical characterization of asclepain c I from the latex *Asclepias curassavica* L.". *Protein J.* 23(6): 403-411.
- Morcelle del Valle, S.R.; Trejo, S.A.; Canals, F.; Avilés, F.X. and Priolo, N.S. (2004). "Funastrain c II, a cysteine endopeptidase purified from the latex of *Funastrum clausum*". *Protein J.* 25: 205-215.
- Obregón, W.D.; Arribére, M.C.; Morcille del Valle, S.; Liggieri, C.; Caffini, N.O. and Priolo, N.S. (2001). "Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits". *J. Protein Chem.* 20: 17-25.
- Obregón, W.D.; Liggieri, C.; Morcille del Valle, S.; Trejo, S.A.; Avilés, F.X. and Priolo, N.S. (2008). "Biochemical and PMF MALDI-TOF analyses of two novel papain-like plant proteinases". Manuscrito enviado a *Protein & Peptide Letters*. (Nro. PPL-180456). (En prensa).
- Patel, B.K. and Jagannadham, M.V. (2003). "A high cysteine containing thiol proteinase from the latex of *Ervatamia heyneana*: purification and comparison with ervatamin B and C from *Ervatamia coronaria*". *J. Agric. Food. Chem.* 51(21): 6326-34.
- Queiroz, K. and Gauthier, J. (1992). "Phylogenetic taxonomy". *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 23: 449-480.
- Safwat, F.M. (1962). "The floral morphology of *Secamone* and the evolution of pollinating apparatus in *Asclepiadaceae*". *Annals of the Missouri Botanical Garden* 49: 45-129.
- Schumann, K. (1895). *Asclepiadaceae*. En: Engler, A. and Prantl, K. Die natürlichen pflanzenfamilien 4(2):189-306.
- Sennblad, B. and Bremer, B. (1996). "The familial and subfamilial relationships of *Apocynaceae* and *Asclepiadaceae* evaluated with rbcL data". *Pl. Sys. Evol.* 202: 153-175.
- Sennblad, B., and Bremer, B. (2002). "Classification of *Apocynaceae* s.l. according to a new approach combining linnean and phylogenetic". *Taxonomy Systematic Biology* 51: 1-21.
- Sequeiros, C.; Torres, M.J.; Trejo, S.A.; Natalucci, C.L. and López, L.M.I. (2005). "Philibertain g I the most basic cysteine endopeptidase purified from the latex of *Philibertia gilliesii* Hook. et Arn. (*Apocynaceae*)". *The Protein Journal* 24(7-8): 445-453.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973). *The principle and practice of numerical classification*. En: Kennedy, D., Park, R.B. (Eds.). Numerical Taxonomy. Freeman Press, San Francisco.
- Sreedevi, N.; Kundu, S.; Medicherla, V. and Jagannadham, M.V. (2003). "Purification and biochemical characterization of a highly active cysteine protease Ervatamin A from the latex of *Ervatamia coronaria*". *Journal of Protein Chemistry* 22(1): 1-13.
- Stevens, W.D. (1983). "New species and names in *Apocynaceae, Asclepiadoideae*". *Phytologia* 53(6): 401-405.
- Stussey, T.F. (1997). "Classification: more than just branching patterns of evolution". *Alisa* 15: 113-124.
- Swarupanandan, K.; Mangaly, J.; Sonny, T. K.; Kishorekumar, K. and Chand Basha, S. (1996). "The Subfamilial and Tribal Classification of the family *Asclepiadaceae*". *Bot. Journal of the Linnean Society* 120: 327-369.
- Trejo, S.A.; López, L.M.I; Cimino, C.V.; Caffini, N.O. and Natalucci, C.L. (2001). "Purification and characterization of a new plant endopeptidase isolated from latex of *Asclepias fruticosa* L. (*Asclepiadaceae*)". *Journal of Protein Chemistry* 20: 445-453.
- Van Welzen, P.C. (1997). "Paraphyletic groups or what should a classification entail". *Taxon* 46:99-103.
- Vairo Cavalli, S.; Arribére, M.C.; Cortadi, A.; Caffini, N.O. and Priolo, N.S. (2003). "Morrenain b I, a papain-like endopeptidase from the latex of *Morrenia brachystephana* Griseb. (*Asclepiadaceae*)". *Journal of Protein Chemistry* 22: 15-22.

Vairo Cavalli, S.E.; Cortadi, A.; Arribére, M.C.; Conforti, P.; Caffini, N.O. and Priolo, N.S. (2001). "Comparison of two cysteine endopeptidases from latices of *Morrenia brachystephana* Griseb. and *Morrenia odorata* (Hook et Arn.) Lindley (*Asclepiadaceae*)". *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 382: 879–883.