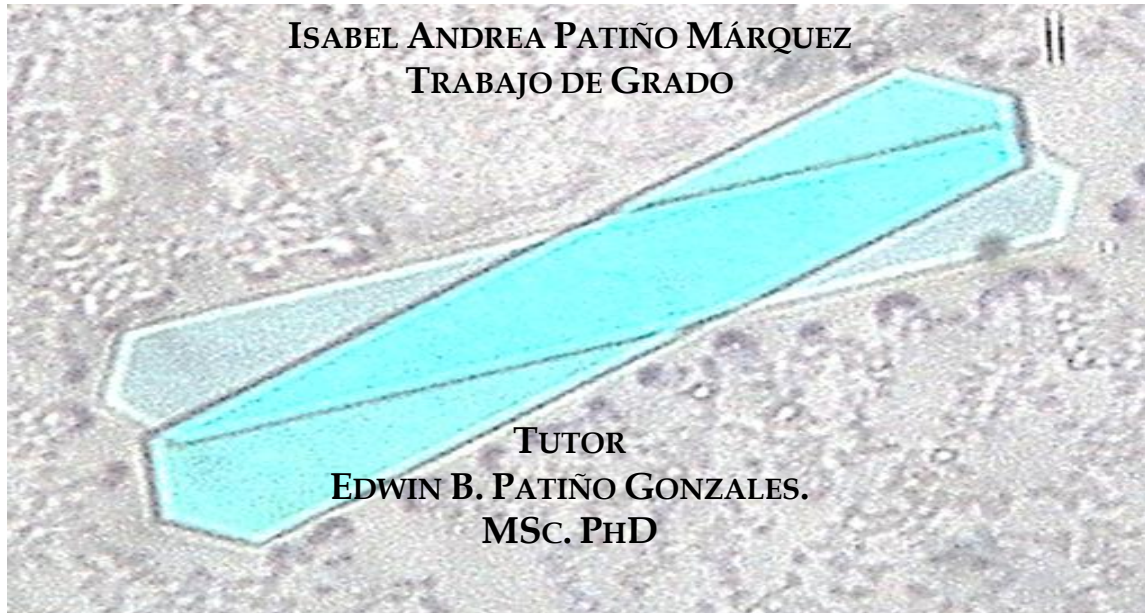


EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CRISTALIZACIÓN DE LA
ENDONUCLEASA G (EndoG) DE *Leishmania (Viannia) panamensis*
COMO UNA PRIMERA APROXIMACIÓN A LOS ESTUDIOS
ESTRUCTURALES DE PROTEÍNAS

ISABEL ANDREA PATIÑO MÁRQUEZ
TRABAJO DE GRADO



TUTOR
EDWIN B. PATIÑO GONZALES.
MSc. PhD

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
MEDELLÍN
2012



“Nuestra Recompensa se Encuentra en el Esfuerzo y No en el Resultado. Un Esfuerzo Total es una Victoria Completa”.

Mahatma Gandhi

TABLA DE CONTENIDO

1.	RESUMEN.....	8
2.	ANTECEDENTES.....	9
2.1	CICLO BIOLÓGICO DEL PARÁSITO.....	11
2.2	APOPTOSIS.....	14
2.3	ENDONUCLEASA G.....	15
2.4	REQUISITOS A SEGUIR PARA CRISTALIZAR PROTEÍNAS.....	16
2.5	CRISTALIZACIÓN.....	18
3.	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	21
4.	HIPÓTESIS.....	23
5.	OBJETIVOS.....	23
5.1	OBJETIVO GENERAL.....	23
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
6.	JUSTIFICACIÓN.....	24
7.	METODOLOGÍA.....	25
7.1	REACTIVOS.....	25
7.2	VECTOR DE EXPRESIÓN.....	25
7.3	CEPA BACTERIANA (<i>E. coli</i> BL21 (DE3)).....	25
7.4	PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES <i>E. coli</i> BL21 (DE3) POR CLORURO DE RUBIDIO.....	26
7.5	TRANSFORMACIÓN.....	26
7.6	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE EndoG DE <i>L. (V) panamensis</i>	27
7.7	RENATURALIZACIÓN Y DIÁLISIS DE LA EndoG DE <i>L. (V) panamensis</i>	28
7.8	PRUEBA DE ACTIVIDAD ENDONUCLEASA DE LA EndoG DE <i>L. (V) panamensis</i>	29
7.9	ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS.....	30
7.10	CRISTALIZACIÓN DE LA EndoG DE <i>L. (V) panamensis</i>	30
8.	RESULTADOS.....	33
8.1	INDUCCIÓN DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA EndoG DE <i>L. (V) panamensis</i>	33

8.2	ELIMINACIÓN DE PROTEÍNAS CONTAMINANTES DE LA EndoG DE <i>L. (V) panamensis</i> PRESENTES EN CUERPOS DE INCLUSIÓN DE <i>E.coli</i>	37
8.3	RENATURALIZACIÓN DE LA EndoG DE <i>L. (V) panamensis</i>	38
8.4	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENDONUCLEASA DE LA EndoG DE <i>L. (V) panamensis</i>	40
8.5	ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS.....	42
8.6	CRISTALIZACIÓN.....	44
9.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	49
10.	PERSPECTIVA.....	50
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	51

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios por permitirme esta oportunidad de cumplir mis metas, llenando mi vida de satisfacción y alegría.

Gracias a mis padres John Edwar y Norelia, por hacer de mí la persona que soy hoy. De ustedes aprendí a tener criterio y saber tomar las mejores decisiones. A mi hermana Paola Alejandra por estar siempre conmigo, levantarme en los malos momentos y compartir mis alegrías.

Al Dr. Edwin Patiño que me brindó todo su apoyo, sus conocimientos y el acompañamiento en todo este proceso, no solo en la parte profesional, sino que me enseñó a crecer como persona.

A Alex Rentería por compartir en este momento de mi vida, a pesar de no entender mucho de lo que hago, siempre tuvo la mejor disposición y comprensión.

Al Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia por haberme entregado todo el conocimiento para lograr ser una profesional. A todos los profesores del instituto que hicieron parte de mi formación académica, en especial a los profesores Jaime Calle y Omar Ocampo, que me permitieron hacer parte de los laboratorios de biología celular y microbiología.

Al Instituto de Química de la Universidad de Antioquia que me recibió como una más de sus estudiantes y sobre todo al Grupo de Investigación GIEM, por el gran apoyo que me brindaron, particularmente al Dr. Carlos Peláez y la Dra. Nora Restrepo directores del grupo GIEM. A mis compañeros David Rodas, Alejandro, Miguel, Wilmar y en general a todos sus integrantes porque siempre tuvieron la mejor disposición.

Una especial gratitud al Dr. Javier Silva por ser una persona tan servicial y colaboradora, aportándome sus conocimientos. También a la Dra. Marcela Manrique que hace parte de esta pequeña familia que es el laboratorio de la línea de Bioquímica y Biofísica del GIEM.

Al Dr. Juan Fernando Álzate y al laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, por su cooperación para la realización de este trabajo.

A mis Amigos en toda la carrera, Laura, Cristina, Edwin, Sara, Rafael, Luis, Andrés, Laura Rueda, Daniela y David, con los que compartí los mejores momentos en esta etapa de mi vida.

A toda mi familia, mi Abuela Genoveva, a todos mis tíos y primos, por su respaldo y compañía.

ABREVIATURAS

(L.): Subgénero *Leishmania*

(V.): Subgénero *Viannia*

°C: Grados Celsius

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ADNmt: ADN Mitocondrial

AIF: Factor Inductor de Apoptosis

BSA: Albúmina Sérica Bovina

CAD: Dnasa Activada por CASPASAS

CASPASAS: Cisteína-Aspartato-proteasas

CPD-6: Carbamil fosfato sintetasa-6

D: Género *Drosophila*

E. coli: *Escherichia coli*

EndoG: Endonucleasa G

BrEt: Bromuro de Etidio

g: Gramo

gp63: Glicoproteína 63

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

GuHCl: Cloruro de Guanidinio

IL-10: Interleucina 10

IMAC: Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados

IPTG: Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido

kb: Kilobase

kDa: Kilodalton

L.: Género *Leishmania*

L: Litro

LB: Medio Luria-Bertani

LC: Leishmaniasis Cutánea

LM: Leishmaniasis Mucosa

LMC: Leishmaniasis Mucocutánea

LPG: Lipofosfoglicano

LV: Leishmaniasis Visceral

M: Molar

MCP: Muerte celular programada

MF: Macrófagos

mg: Miligramo

ml: Mililitro

NCBI: National Center for Biotechnology Information

nm: Nanómetros

OMS: Organización Mundial de la Salud

pb: Pares de Bases

PDB: Protein Data Bank

PMN: Polimorfos nucleares

PEG: Polietilenglicol

PS: Fosfatidilserina

rpm: Revoluciones por minuto

SDS: Sodio Dodecilsulfato

SDS-PAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con SDS

SIVIGILA: Sistema Nacional de Vigilancia en Salud pública

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

β -ME: beta-mercapto etanol

μ g: Microgramo

μ l: Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo Biológico de <i>Leishmania</i>	12
Figura 2.	Metodología de Cristalización	19
Figura 3.	Representación Esquemática Vector de Expresión pET28/EndoG ..	33
Figura 4.	Secuencia de Nucleótidos y Aminoácidos de la EndoG de <i>L. (V) panamensis</i>	34
Figura 5.	Inducción de la Proteína EndoG y Prueba de Solubilidad de la Proteína	35
Figura 6.	Proteína EndoG Extraída de Cuerpos de Inclusión por Agente Desnaturalizante 8M GuHCl	37
Figura 7.	Purificación de EndoG por IMAC	38
Figura 8.	Proteína EndoG Renaturalizada	39
Figura 9.	Actividad Endonucleasa de la EndoG	41
Figura 10.	Alineamiento de las Secuencias de Aminoácidos de la Proteína EndoG	42
Figura 11.	Comportamiento de la Proteína EndoG en los Diferentes Buffer de Cristalización	44
Figura 12.	Mejores Condiciones de Cristalización	46
Figura 13.	Cristales Birrefringentes bajo la Luz Polarizada	47

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Especies de <i>Leishmania</i> en América	10
Tabla 2.	Buffers de Cristalización (Hampton Research Screen HR2-110)	31
Tabla 3.	Producción de la Proteína EndoG <i>L. (V) panamensis</i>	36
Tabla 4.	Prueba de Actividad Endonucleasa de la EndoG	40
Tabla 5.	ClustalW2 Análisis de Porcentaje de Identidad de las secuencias de aminoácidos de la Proteína EndoG	43
Tabla 6.	Formas Cristalinas y Cristales de la Proteína EndoG	45

1. RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad causada por parásitos protozoos del género *Leishmania*. Esta enfermedad afecta tanto regiones tropicales como subtropicales y ha sido registrada en aproximadamente 88 países en todo el mundo. El conocimiento de los mecanismos de infección desarrollados por el parásito de *Leishmania*, podría ser de gran ayuda para controlar su diseminación en el humano. Uno de los mecanismos desarrollados por *Leishmania* para el establecimiento de la enfermedad en el mamífero, es la apoptosis. Datos recientes muestran que algunos promastigotes presentes en el inoculo que entra con la picadura del vector sufren apoptosis para favorecer a los promastigotes que permanecen vivos y así desencadenar el proceso infeccioso. A nivel inmune, las funciones de los fagocitos son suprimidas por el reconocimiento de la fosfatidilserina (PS) en la membrana de los parásitos apoptóticos. El mecanismo de apoptosis en *Leishmania* es activado por una vía independiente de CASPASAS, liderada por la presencia de la enzima Endonucleasa G (EndoG), que degrada el ADN nuclear. La participación de EndoG en la apoptosis del parásito puede ser de especial interés para una posible estrategia de inhibición de la activación de EndoG y como resultado inhibir la apoptosis en *Leishmania*; lo que podría resultar en una menor capacidad de replicación o de infección del parásito. En la actualidad no se conoce la estructura tridimensional de la EndoG *Leishmania (Viannia) panamensis* que permita conocer a nivel molecular las propiedades funcionales de esta proteína y hacer una modelación para el diseño de una molécula terapéutica que posibilite el tratamiento de la enfermedad. Debido al tamaño molecular de la EndoG que es de aproximadamente 39kDa, la determinación de su estructura tridimensional se debe hacer por técnicas como la cristalografía de rayos-X. Para esto se necesita cristalizar la proteína activa para los análisis de difracción. En este trabajo se desarrolló la primera etapa de cristalización de la proteína EndoG de *Leishmania (Viannia) panamensis*, pudiéndose lograr las primeras condiciones en la obtención de cristales.

2. ANTECEDENTES

La leishmaniasis hace referencia a una agrupación de varias infecciones que son causadas por protozoos parásitos del género *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Esta enfermedad está distribuida tanto en regiones tropicales como subtropicales alrededor del todo el mundo (www.who.int/tdr) estando presente en todos los continentes, exceptuando la Antártida. La leishmaniasis ha sido registrada en aproximadamente 88 países y se calcula que anualmente ocurren en el mundo alrededor de 12 millones de casos de leishmaniasis y existen aproximadamente 350 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad (Desjeux, 2004), lo que hace que está sea un problema de salud pública a nivel mundial.

En la actualidad, el género *Leishmania* se divide en dos subgéneros, que se diferencian en el lugar de desarrollo del parásito en el intestino de los flebótomos vectores: el subgénero *Leishmania*, se desarrolla en el intestino medio o anterior, por otro lado, el subgénero *Viannia*, se transforma en el intestino posterior, medio y anterior de los flebótomos (Gossage, et al., 2003, Sánchez and Sáenz, 2004). Morfológicamente las distintas especies de *Leishmania* no se pueden identificar. Para llegar a la clasificación de las especies del género *Leishmania* se debe considerar ciertas características como: a) biológicas: que corresponden a la morfología, tipo de desarrollo en el flebótomo vector, crecimiento en los medios de cultivo, desarrollo en el hospedador vertebrado; b) bioquímicas: electroforesis de isoenzimas, análisis del ADN del núcleo y del kinetoplasto; c) inmunológicas: reactividad del parásito con anticuerpos monoclonales y serotipificación del factor de excreción y taxonomía numérica para definir mejor la evolución molecular y la relación filogenética de los parásitos del género *Leishmania* (Sánchez and Sáenz, 2004). En el subgénero *Leishmania* se encuentran clasificadas todas las especies del Viejo Mundo y algunas del Nuevo Mundo en el complejo mexicana, mientras que el subgénero *Viannia* está restringido a especies del continente americano (Marín, et al., 2008). En América Latina, los subgéneros de *Leishmania* y *Viannia* contienen numerosas especies de las que sólo algunas infectan al hombre (**Tabla 1**).

Subgénero <i>Leishmania</i>	Subgénero <i>Viannia</i>
<i>Leishmania (L) chagasi</i> *	
<i>Leishmania. (L) enrietti</i>	<i>Leishmania (V) brasiliensis</i> *
<i>Leishmania (L) mexicana</i> *	<i>Leishmania (V) peruviana</i> *
<i>Leishmania (L) pifanoi</i> *	<i>Leishmania (V) guyanensis</i> *
<i>Leishmania (L) hertigi</i>	<i>Leishmania (V) panamensis</i> *
<i>Leishmania (L) amazonensis</i> *	<i>Leishmania (V) lainsoni</i> *
<i>Leishmania (L) deanei</i>	<i>Leishmania. (V) shawi</i> *
<i>Leishmania (L) aristidesi</i>	<i>Leishmania. (V) naiffi</i>
<i>Leishmania (L) garhami</i> *	<i>Leishmania (V) colombiensis</i>
<i>Leishmania (L) venezuelensis</i> *	<i>Leishmania (V) equatorensis</i>
<i>Leishmania (L) forattinii</i>	

Tabla 1. Especies de *Leishmania* en América. Especies de *Leishmania* que infectan al hombre en el continente Americano (Sánchez and Sáenz, 2004)

La forma como se transmite la infección a los humanos y a otros mamíferos, es por la picadura de un mosquito hembra infectado con parásitos. En el viejo mundo el vector hematófago pertenece al género *Phlebotomus* o en el nuevo mundo *Lutzomya* (Lewis, 1971). La infección en el hombre se puede dar a partir de parásitos provenientes de un reservorio animal (ciclo zoonótico), o a partir de parásitos que el vector ha tomado de otro hospedero humano (ciclo antroponótico) (Romero and Sánchez, 2007). Existen tres formas clínicas de la enfermedad: leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV) (Desjeux, 2004). Las diferencias en las manifestaciones clínicas son un fenómeno que aún no está dilucidado completamente, posiblemente se deba a las veinte diferentes especies del parásito existentes (www.who.int/tdr) o a la inmunidad del hospedador. La variabilidad de la enfermedad tiene diferentes niveles de gravedad presentando lesiones cutáneas que puede cicatrizar espontáneamente, hasta infecciones viscerales que pueden conducir a la muerte. La especie infectante está determinada por el vector que la transmite y, a su vez, la presencia del vector está determinada por las condiciones ecológicas de cada región. Por ejemplo; la LMC es causada por la infección con *Leishmania braziliensis*, en cambio, la LV es el resultado de la infección con *Leishmania chagasi*. En Colombia, la

forma clínica más frecuente es la LC, con 10.248 casos reportados en el 2008, siendo *Leishmania (Viannia) panamensis* (*L. (V) panamensis*) la especie más comúnmente implicada, aunque se producen las otras dos formas clínicas principales de la enfermedad, es decir, la mucosa y visceral (Toro, et al., 2011). Por otro lado, las consecuencias derivadas de la LMC son la destrucción extensa de las cavidades orales, nasales y faríngeas, llevando a lesiones que causan mutilación y desfiguración del rostro; en el caso de la LV, se ven comprometidos importantes órganos como el hígado, el bazo y la médula ósea (Ashkan and Rahim, 2008, Bari, 2009).

En nuestro país la leishmaniasis se presenta en forma endémica y se encuentra en el 91% de todo el territorio ubicado bajo los 1750 metros a nivel del mar. Los focos se encuentran en una gran diversidad de regiones naturales que incluyen zonas selváticas del bosque seco tropical como la Costa Caribe, la región Andina donde se cultiva el café y áreas de llanos y desiertos localizadas en región interandina, también en el oriente del país y en la península de la Guajira (Romero and Sánchez, 2007).

2.1 CICLO BIOLÓGICO DEL PARÁSITO

El ciclo biológico de *Leishmania* comienza cuando un vector ingiere sangre de un mamífero infectado previamente con parásitos de *Leishmania*, los cuales se encuentran en los macrófagos en su forma de amastigote, no flagelados. Los amastigotes ya ubicados en el intestino del vector, inician la transformación de la forma amastigote a promastigote procíclico; la transformación del amastigote a promastigote ocurre dentro de las siguientes 24 a 48 horas de haber ingerido la sangre con los parásitos (Sánchez and Sáenz, 2004). Los promastigotes se multiplican activamente por división binaria longitudinal. En esta fase el parásito se encuentra ubicado en la parte posterior del intestino del insecto, es poco infeccioso para el mamífero, posee poca motilidad y es altamente replicativo. Luego el parásito disminuye su capacidad replicativa y pasa por las formas de promastigote nectonomado y promastigote leptomonado hasta llegar a su forma final alargada conocida como promastigote metacíclico, la cual es altamente infectiva, motil y se encuentra ubicada en la parte posterior del intestino del insecto y en el aparato picador del mismo (Gossage, et al., 2003). Este proceso de transformación de promastigote procíclico a metacíclico es conocido como metaciclogénesis (Sacks,

1989). En el tubo digestivo de la hembra del vector, los amastigotes son estructuras piriformes o fusiformes que presenta la extremidad posterior más delgada que la anterior, su cuerpo es flexible y se mueve por la acción de un flagelo libre situado en la parte posterior que es casi de igual tamaño que el cuerpo; el núcleo se localiza en el centro de la célula y el kinetoplasto entre el núcleo y la extremidad anterior somática; el axonema o rizonema (flagelo rudimentario) parte del kinetoplasto y se continúa con el flagelo libre (Sánchez and Sáenz, 2004) (**Figura 1**).

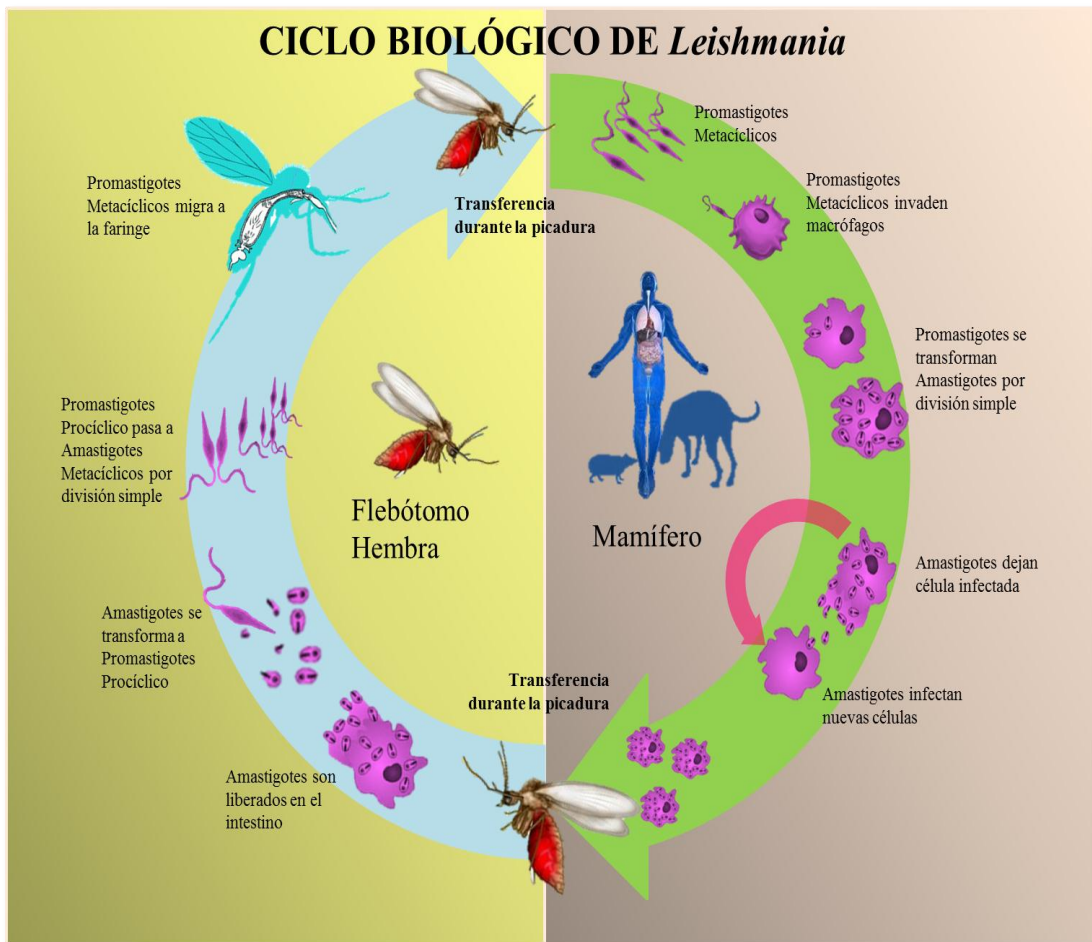


Figura 1. Ciclo Biológico de *Leishmania*. Se pueden observar los distintos estadios de *Leishmania* en el Mamífero (flecha verde) y en el vector Flebótomo (flecha azul claro).

Cuando el flebótomo se alimenta de nuevo de sangre, deposita la forma metacíclica del parásito en el interior de la piel, dándole continuidad así al ciclo de transmisión de la infección. Aquí, los parásitos inoculados son fagocitados por los polimorfos nucleares (PMN) en primer lugar y luego por los macrófagos (MF) (Oshaghi, et al., 2009). Los

PMN sirve como células huésped intermediarias inmediatamente después de la infección. Dentro de los PMN, los promastigotes subsisten en una etapa sin multiplicación (Van Zandbergen, et al., 2006). Los promastigotes no migran activamente hacia los macrófagos, permanecen en el espacio intercelular y activan el complemento por una vía alternativa, que inicia la acumulación de neutrófilos y macrófagos. Aunque muchos promastigotes son destruidos por los leucocitos PMN, unos pocos se transforman en amastigotes en las células del sistema retículo endotelial, en un periodo de 3 a 4 horas en promedio, permanecen en estadio estacionario por 36 horas aproximadamente y, luego, empiezan a reproducirse (Peters and Sacks, 2009). El amastigote tiene forma ovalada o redondeada, carece de flagelos y de membrana ondulante y, por tanto, es inmóvil (Sánchez and Sáenz, 2004). La adhesión entre el parásito y los macrófagos es una etapa fundamental para la invasión de las células del huésped. Sobre la superficie de la *Leishmania* han sido identificados numerosos receptores, entre los más importantes la glicoproteína 63 (gp63) y el lipofosfoglicano (LPG), que son usados por los parásitos para adherirse a los macrófagos (Marín, et al., 2008, Sánchez and Sáenz, 2004).

Datos recientes demuestran que la supervivencia de los parásitos depende de los promastigotes apoptóticos presentes en el inóculo y que son fagocitados por los polimorfos nucleares. El reconocimiento de promastigotes apoptóticos por los PMN es el caballo de Troya para una entrada silenciosa hacia el hospedador final que es el MF. Siendo entonces la presencia de promastigotes apoptóticos un prerrequisito para la supervivencia dentro de los fagocitos profesionales, inhibiendo mecanismos efectores antimicrobianos (Van Zandbergen, et al., 2006). Las funciones de los fagocitos son suprimidas por el reconocimiento de la fosfatidilserina (PS) en la membrana de las células apoptóticas. Este paso se caracteriza por la liberación de citocinas antiinflamatorias, como el TGF- β e IL-10 y regulación negativa de las citoquinas proinflamatorias como TNF- α . En consecuencia, el reconocimiento de PS previene la respuesta inmune. En otras palabras los promastigotes apoptóticos contribuyen a la supervivencia intraneutrofílica de los parásitos no apoptóticos. El grupo de Zandbergen demostró que los parásitos morían dentro de los neutrófilos, sí estos eran fagocitados en ausencia de promastigotes apoptóticos (Van Zandbergen, et al., 2006).

2.2 APOPTOSIS

La apoptosis es una muerte celular programada que contribuye en la formación de órganos y tejidos de un organismo, lo que quiere decir que esta muerte celular, no es accidental, la apoptosis sigue una secuencia de pasos controlados que conducen a un organismo o a un grupo de células del organismo a su destrucción. El mecanismo de apoptosis juega un papel importante en el desarrollo de los organismos multicelulares y en el mantenimiento y regulación de tejidos en condiciones fisiológicas y patológicas (Pellettieri and Sanchez Alvarado, 2007). Por ejemplo, la participación de la apoptosis en la morfogénesis de los dígitos independientes y libres de estructuras como las extremidades, que se forman después de una muerte masiva de células de tejido mesenquimal (Zuzarte-Luis and Hurlle, 2002). En la homeostasis del sistema inmune, la apoptosis también juega un papel preponderante, la mayoría de los linfocitos B y T que se generan mueren durante el re-arreglo genético de los genes que codifican para sus receptores de antígeno. Por último, pero no menos importante, es la eliminación de células con daños severos en el ADN o células cancerosas, se ha visto que son removidas por los eventos apoptóticos en los organismos (Pellettieri and Sanchez Alvarado, 2007, Rathmell and Thompson, 2002).

Las células que sufren apoptosis presentan cambios morfológicos que las diferencian de las células normales. Los cambios más característicos son el encogimiento, deformación, condensación de la cromatina y marginación de la membrana nuclear. Los cuerpos apoptóticos aparecen como el resultado final del proceso de muerte celular programada (MCP). Todos estos cambios morfológicos en las células son consecuencia de la activación enzimática. Las proteasas aspartato específicas dependientes de cisteína (CASPASAS) juegan un papel central en la red de señalización de la apoptosis y son consideradas la vía principal de muerte (Leist and Jaattela, 2001). Sin embargo, la apoptosis también puede ser inducida por receptores celulares implicados en muerte celular, como los receptores del factor transformante de necrosis tumoral (TNF) (Ashkenazi, 2002). En síntesis, la apoptosis es un proceso ampliamente diseminado en la mayoría de organismos y de importancia biológica. La apoptosis está involucrada en el desarrollo, diferenciación, proliferación, homeostasis y regulación.

Como se mencionó anteriormente, *Leishmania* utiliza la apoptosis de algunos parásitos para poder establecer la infección, lo que significa que este mecanismo de muerte celular es parte integral de su ciclo de vida (Van Zandbergen, et al., 2006). Las características bioquímicas y morfológicas de la apoptosis de *Leishmania* fueron previamente observadas bajo condiciones de estrés tales como: ausencia de suero en el medio de cultivo, choque térmico y grandes cantidades de óxido nítrico (Zangger, et al., 2002). Aunque el ADN de *Leishmania* fue fragmentado como suele suceder en la apoptosis, el grupo de Zangger pudo determinar que esta fragmentación característica del evento apoptótico no fue regulada por las CASPASAS. En otras palabras, el grupo de Zangger encontró un evento apoptótico en *Leishmania* independiente de la vía las CASPASAS (Zangger, et al., 2002). Ya en 2001, el grupo de Parrish había demostrado que la mitocondria estaba involucrada en los mecanismos apoptóticos de los invertebrados como *Caenorhabditis elegans*. Aún más, demostraron que la fragmentación de ADN era el producto de la enzima mitocondrial CPS-6 y que esta proteína era homóloga a la proteína Endonucleasa G (EndoG) de mamíferos; la cual estaba implicada en los procesos apoptóticos (Parrish, et al., 2001, Van Loo, et al., 2001). Este resultado fue confirmado por el grupo de Ishihara y Shimamoto quienes mostraron evidencia de que la fragmentación del ADN nucleosomal era debido a la actividad de la Endonucleasa G bajo condiciones de estrés oxidativo (Ishihara and Shimamoto, 2006). De acuerdo a los resultados de inmunoblot, la EndoG se localizó predominantemente en la mitocondria y en una menor proporción en el núcleo, y la fragmentación nucleosomal fue el resultado de la translocación de la enzima EndoG desde la mitocondria hasta el núcleo (Ishihara and Shimamoto, 2006, Van Loo, et al., 2001). Los extractos de mitocondria de amastigotes axénicos y analizados por inmunoblot mostraron que en los Tripanosomátidos EndoG también era una proteína mitocondrial y que seguido a la inducción de la muerte celular del parásito de *Leishmania* esta era liberada al núcleo en donde participa de la muerte celular de los parásitos (Gannavaram, et al., 2008, Rico, et al., 2009, Van Loo, et al., 2001).

2.3 ENDONUCLEASA G (E.C.3.1.30)

La Endonucleasa G es una nucleasa mitocondrial que es implicada en la replicación del ADN mitocondrial (ADNmt), la recombinación del ADNmt y reparación/degradación

del ADNmt (Irvine, et al., 2005, Van Loo, et al., 2001). De acuerdo a la comisión enzimática esta enzima es una hidrolasa (E.C.3.1.30). El nombre de Endonucleasa G, viene dado debido a su preferencia de generar cortes en lugares adyacentes a residuos de guanina. La EndoG de los Tripanosomátidos pertenece a la familia de ADN/ARN nucleasas no específicas. Esta familia de ADN/ARN de nucleasas se caracteriza por presentar un motivo **DRGH**, conocido como “ $\beta\beta\alpha$ metal-ion-finger”. Su actividad es principalmente dependiente de Mg^{+2} , Mn^{+2} o Co^{+2} , lo que la distingue de las ADNsas I y II (Van Loo, et al., 2001). Sin embargo en la EndoG de los Tripanosomátidos, el ácido aspártico (D) es remplazado por una serina (S). El análisis de comparación de las secuencias de amino ácidos de la EndoG muestra que la identidad de la EndoG de *Tripanosoma* y *Leishmania* con respecto a la EndoG de humano es aproximadamente del 30% (Gannavaram, et al., 2008). Los estudios revelan que la Endonucleasa G es otra de las proteínas junto al agente inductor de apoptosis (AIF), smac/DIABLO y el citocromo C que salen de la mitocondria durante los procesos de MCP facilitando la degradación del ADN (Wang, 2001). La Endonucleasa G junto a la nucleasa activada por CASPASAS CAD, aseguran que la apoptosis sea un proceso irreversible al translocarse al núcleo y degradar la cromatina (Lee, et al., 2002).

La participación de EndoG en la apoptosis del parásito, una vía que es independiente de CASPASAS en este organismo, podría ser de especial interés para una posible forma de inhibir la activación de EndoG y como resultado inhibir la apoptosis en *Leishmania* lo que podría resultar en una menor capacidad de infección del parásito.

2.4 REQUICITOS A SEGUIR PARA CRISTALIZAR PROTEÍNAS

La cristalografía de rayos-X necesita de cristales de proteínas para poder determinar la estructura terciaria. La cristalización de proteínas es el paso limitante en la obtención de estructuras tridimensionales de las proteínas. El proceso que se debe seguir para poder lograr la dilucidación de una estructura por este método consta de una serie de pasos: lo primero que se debe obtener es una proteína altamente pura, lo segundo es que debe estar en altas concentraciones que permita realizar diferentes pruebas de cristalización, y tercero lograr conseguir cristales individuales que se puedan analizar por cristalografía de rayos-X, es decir de buen tamaño y con el orden interno suficiente que permita

obtener espectros de difracción informativos en el rango atómico de resolución (Michael M, et al., 2009).

Por tanto, el primer paso como se indicó, es la obtención de cristales adecuados para someterlos a difracción. Un cristal es un sólido ordenado en el que se repite una unidad organizativa básica. La cristalización de una proteína se define como un proceso de precipitación controlada, en el cual la proteína se encuentra en una solución sobresaturada sin que la proteína sea desnaturalizada. Este fenómeno se da por la adición ordenada de moléculas de proteína a un núcleo inicial de cristalización. La condición de sobresaturación supone que debe haber más proteína disuelta de la que acepta la solución en el punto de saturación. Si la solución estuviera solo saturada no habría cambio de fase: la saturación es un punto de equilibrio, en el que la solución ha aceptado todo el soluto que puede disolverse, pero nada más, por lo que no es posible que el soluto deje de serlo y se separe como sólido.

Para lograr unas condiciones adecuadas de sobresaturación, hay que tener en cuenta algunas estrategias, como comenzar con concentraciones elevadas de la proteína y aumentar la concentración gradual del agua, introduciendo además cambios que disminuyan la solubilidad de la proteína. Los factores que se manipulan usualmente que afectan la solubilidad de la proteína son el pH, la temperatura, la presencia o no de sales, la adición de solventes orgánicos, el uso de precipitantes poliméricos y ligandos de la proteína.

Aunque la cristalización es un proceso sometido a rigurosas y precisas leyes químico-físicas, el tratamiento que se da aquí, para alcanzar las condiciones adecuadas para que se dé el cristal, es predominantemente empírico. Sin embargo, obtener un cristal que difracte bien los rayos-X depende de algunos factores como, la calidad de la proteína, la homogeneidad de la proteína, estabilidad de la proteína y el ambiente químico en el cual la proteína cristaliza.

La calidad de la proteína (o pureza): La calidad se refiere estrictamente a su pureza. Esta pureza debe ser tan alta como sea posible, aceptándose comúnmente que al menos alcance un 90%. Se requieren proteínas altamente puras para que los cristales formados

puedan tener un patrón de cristalización que difracte los rayos-X, las impurezas evitan que el cristal se forme de manera homogénea o afectan limitando el tamaño del cristal, lo cual en última instancia no permite la difracción del cristal o datos que no se pueden analizar (Moreno and Sanchez, 2003).

Homogeneidad: La homogeneidad de la proteína se refiere, a las modificaciones post-traduccionales (fosforilación, grados diversos de glicosilación, formas alternativas de procesamiento, formas isoenzimáticas, etc.) que la proteína pueda sufrir o las interacciones con compuestos químicos que la modifiquen que pueden ser resultado de la manipulación experimental (grados distintos de oxidación, proteólisis, desnaturalización parcial, deaminación, etc.) (Moreno and Sanchez, 2003).

La estabilidad: Hace referencia a las partes flexibles de la proteína en los extremos, lo que impide una precipitación homogénea. Las condiciones de cristalización (pH, temperatura, adición de ligandos y protectores de grupos -SH) deben buscar preservar al máximo la estabilidad de la proteína (Moreno and Sanchez, 2003).

2.5 CRISTALIZACIÓN

La formación de cristales de proteínas ocurre en un medio sobresaturado, en este punto se comienza dar un proceso llamado nucleación, iniciándose la formación del cristal (Penkova, et al., 2006, Sygusch, et al., 1996). Las fuerzas precisas que determinan la nucleación no están totalmente definidas. La metodología utilizada en este trabajo fue la cristalización de la proteína EndoG por medio de la gota colgante por difusión de vapor, además se utilizaron diferentes relaciones proteína buffer. La gota colgante consiste de una mezcla de la proteína con el buffer de cristalización en un volumen final que puede estar entre 1-3µl. Luego la mezcla se coloca en una cámara sellada que contiene entre 250-500 µl del mismo buffer (reservorio) y se incuba a temperatura ambiente (**Figura 2**).

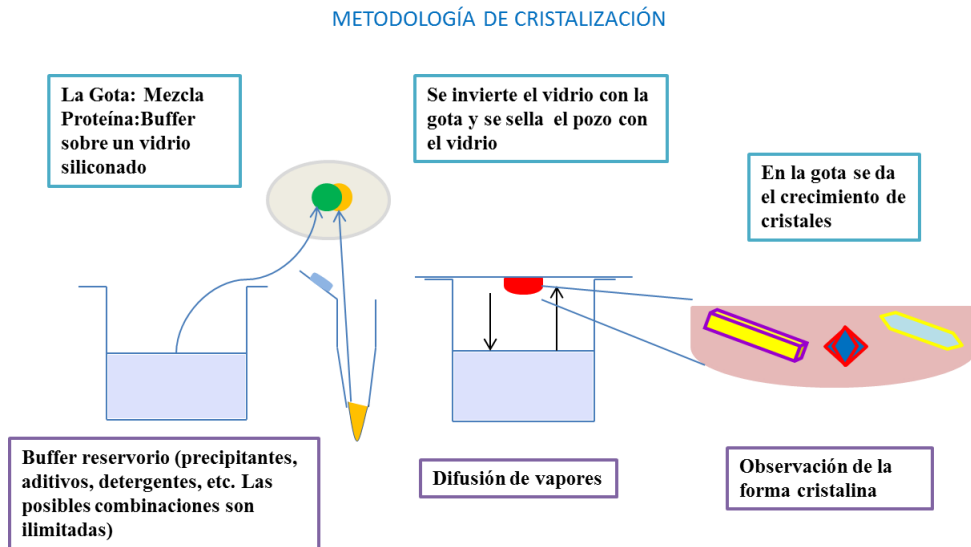


Figura2. Metodología de Cristalización. Método de la gota colgante por difusión de vapor. Los pozos del plato de cristalización contiene el buffer reservorio. El vidrio siliconado con la gota (rojo) representa la relación proteína/buffer. La cámara es sellada para que ocurra el proceso de difusión de vapores y posterior crecimiento de cristales en la gota.

La concentración de los reactivos del buffer es menor en la gota con respecto al reservorio, y por tanto la gota pierde poco a poco el agua hasta que las concentraciones del precipitante en la gota y el reservorio son iguales. Entonces es así como, el proceso nucleación y el posterior crecimiento del cristal se da por la difusión de vapor dentro de la cámara (Jancarik, 1991). Existen dos modalidades principales de esta técnica. En la modalidad de *gota colgante*, la gota se deposita sobre un cubreobjetos siliconado, que luego se invierte y se utiliza para sellar el pocillo de una placa multi-pozos, de modo que la gota quede dentro del espacio sellado, separada de la solución de cristalización presente en el pozo (**Figura 2**). La segunda modalidad es la *gota sentada*, donde la gota se asienta sobre una elevación plana o cóncava situada sobre el nivel de la solución de cristalización. Al igual que la otra metodología el espacio es cerrado con una lámina flexible de plástico adhesivo y transparente, sellando el plato de 96 pozos.

La evaluación de los cristales es un proceso relativamente simple, el cual se realiza por medio de un microscopio. El tiempo para hacer estas observaciones puede ser a partir de las 24 horas, dejando los platos de cristalización en reposo, con el fin de disminuir las perturbaciones durante la nucleación y crecimiento del cristal.

En este trabajo se desarrolló una primera etapa de estandarización de la cristalización de la proteína EndoG de *L.(V) panamensis*, pudiéndose lograr las primeras condiciones en la obtención de cristales de la EndoG, para lo cual, se tuvieron que implementar protocolos de producción de proteína EndoG recombinante a gran escala, protocolos de purificación de la EndoG, como también, protocolos para la renaturalización de la EndoG que permitieran obtener proteína activa y en altas concentraciones, manteniendo su actividad endonucleasa y logrando al final obtener cristales de la EndoG de *L.(V) panamensis*.

3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Siendo la leishmaniasis una de las enfermedades tropicales más importantes y con una distribución mundial, se ha venido desplegando en los últimos años, la investigación hacia nuevos tratamientos y un posible desarrollo de medicamentos que ataquen este parásito sin provocar tantos efectos adversos y menos toxicidad. Estos estudios se centran en entender como es el funcionamiento biológico a nivel molecular de este organismo en su ciclo vital, todo con el fin de encontrar blancos moleculares que permitan el desarrollo de drogas que combatan esta enfermedad.

Esta búsqueda a dado como resultado conocer mas a fondo mecanismos que el parásito a logrado desarrollar para adaptarse a su hospedadores mamíferos, ampliando el rango de conocimientos y de igual manera ampliando las posibilidades en cuanto a blancos moleculares que permitan el desarrollo de nuevos tratamientos. Uno de estos mecanismos de adaptación encontrados en esta búsqueda, es la apoptosis, que años atrás era totalmente desconocida la presencia de muerte celular programada en organismos unicelulares, desconociéndose también cual era la función de que un organismo como *Leishmania* contara con este tipo de respuestas en algunas de sus fases de su ciclo biológico.

Dilucidar las proteínas implicadas del parásito de *Leishmania* en el mecanismo de la apoptosis sería de suma importancia, no solo para el tratamiento de la enfermedad, si no que serviría como modelo molecular para el estudio de organismos eucariotas más complejos. Investigaciones anteriores han podido demostrar la presencia de mecanismos de muerte programada por diferentes tipos de estímulos en parásitos Tripanosomátidos. Dicho mecanismo tiene como enzima clave para el desencadenamiento de la apoptosis, la Endonucleasa G (EndoG), la cual se ha podido identificar en el genoma de *L. (V) panamensis*, conociéndose algunas de sus características, aunque no se conoce a un su estructura tridimensional, que permitiría entender más a fondo las rutas e interacciones en las cuales esté involucrada esta enzima.

La elucidación de la estructura tridimensional de proteínas es de suma importancia científica, ya que permite conocer a nivel molecular las interacciones entre proteínas,

mecanismos de acción y transporte, la relación entre estructura y propiedades funcionales, su relación filogenética y evolutiva.

La proteína EndoG juega un papel fundamental para el desencadenamiento de la infección y por ende, el progreso del parásito dentro del mamífero, se puede pensar que esta proteína es un posible blanco molecular a futuro que permitiría entender vías e interfaces de interacción en el mecanismo de apoptosis en *Leishmania*.

Hasta el día de hoy no hay reportado ninguna estructura de alguna proteína que sea de alta similitud con la proteína EndoG de *L. (V) panamensis*. Lo que complica el estudio utilizando métodos computacionales para simulación de posibles moléculas que interactúen con la EndoG, o proteínas involucradas en esta vía de apoptosis. Un diseño “*in silico*” podría estar sesgado ya que la información reportada hasta el día de hoy en el PDB (Protein Data Bank) en cuanto a proteínas cercanas a EndoG, que pueden ser de otros organismos esta bastante limitada. Por esto se planteó, qué, la proteína EndoG de *L. (V) panamensis* podría ser cristalizada sin perder su función endonucleasa utilizando el método de la gota colgante, dando el primer paso hacia la elucidación de una estructura tridimensional de la proteína funcional de un parásito que afecta a un gran número de personas en Colombia.

4. HIPÓTESIS

La EndoG de *L. (V) panamensis* puede ser cristalizada sin perder la actividad endonucleasa.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

5.1.1 Determinar las condiciones de cristalización de la EndoG de *L. (V) panamensis* como un paso inicial para los estudios estructurales de proteínas.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.2.1 Expresar la proteína EndoG de *L. (V) panamensis* en *E. coli*.

5.2.2 Optimizar las técnicas de purificación de proteínas para la obtención de la proteína EndoG de *L. (V) panamensis* altamente pura.

5.2.3 Determinar la actividad endonucleasa de la EndoG de *L. (V) panamensis* por medio de ensayos de digestión de ADN genómico humano.

5.2.4 Estandarizar la cristalización de la proteína EndoG de *L. (V) panamensis*.

6. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de la estructura tridimensional de proteínas ha sido un factor fundamental para identificar y acelerar el proceso de descubrimiento de drogas basadas en estructura. El diseño de este tipo de drogas es definido como la búsqueda de moléculas que encajen en el sitio de unión de un blanco molecular de manera que puedan formar interacciones favorables. Por lo que es fundamental conocer la estructura tridimensional de dicho blanco. Con este propósito se recurre a uno de los métodos computacionales más usados en este campo: “el acoplamiento molecular automatizado” (Kitchen, et al., 2004). Este método consiste en calcular por medio de un programa (software), cuál es la posición más favorable que tendría una molécula con el blanco molecular. A partir del resultado, se puede trabajar con moléculas hipotéticas que no se tienen en el laboratorio. En la industria farmacéutica es común trabajar con las llamadas “bibliotecas virtuales”, colecciones de miles o millones de moléculas hipotéticas. Sin embargo, después de hacer los cálculos, estas moléculas virtuales pueden ser fabricadas y evaluadas biológicamente.

Como se menciona anteriormente, las estructuras tridimensionales son necesarias para determinar las interfaces de unión y/o los cambios estructurales que están involucrados en la actividad de las proteínas. La enzima EndoG de *Leishmania* se ha mostrado como una molécula clave involucrada en la infectividad del parásito y el establecimiento de la Leishmaniasis. Ya que EndoG participa en los procesos de apoptosis en el parásito *Leishmania* y que la presencia de los parásitos apoptóticos favorece la infección esta proteína se convierte en un excelente candidato para los estudios estructurales que puedan ser utilizados para el diseño de inhibidores de su actividad. Si conociéramos la estructura tridimensional de la enzima EndoG de *Leishmania*, se podría comenzar a realizar una búsqueda de identificación, caracterización y muy posiblemente síntesis de moléculas que potencialmente podrían afectar la actividad biológica de la enzima EndoG; ciencia conocida como diseño racional de drogas basado en estructura. La base del diseño racional de drogas es la identificación de un blanco molecular crítico de un proceso infeccioso o un agente patógeno. EndoG debido a su participación en el proceso infeccioso de *Leishmania*, se convierte en un excelente blanco molecular para el estudio de su estructura.

7. METODOLOGÍA

7.1. REACTIVOS

Los reactivos utilizados para la preparación de los buffer: Cloruro de Guanidinio, Tris, Triton X-100, Cloruro de Sodio, Glutación Oxidado y reducido, Urea fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y Amresco. Los suplementos para la preparación de medios de cultivo, la Triptona, el Extracto de Levadura, el Agar-Agar, se compraron en Amresco. La columna plástica y la resina de Níquel-Profinity utilizadas en la purificación de la proteína EndoG por IMAC se compraron en Bio-Rad. El kit de cristalización se le compró a Hampton Research. El sistema de ultra concentración AMICON y la membrana YM3 se compraron en Purificación y Análisis. Las membranas para diálisis (Spectra/Por Dialysis Membrane) fueron adquiridas a Avántika.

7.2 VECTOR DE EXPRESIÓN

Se utilizó el vector de expresión pET28 (Novagen) que contiene el gen de resistencia a Kanamicina (kan^r). El ADNc que codifica para la proteína EndoG de *L. (V) panamensis* está entre los sitios BanHI y XhoI. El vector fue usado en la inducción y expresión de la EndoG. Aprovechando los dos His-tag del vector, en el amino y carboxilo terminal de la proteína para la purificación por IMAC. El vector pET28/EndoG fue donado por el Dr. Juan Fernando Álzate del Grupo de Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

7.3 CEPA BACTERIANA (*E. coli* BL21 (DE3))

Cepa *E. coli* B. Genotipo: F⁻ ompT gal dcm lon hsdSB (rB- mB-) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]). *E. coli* BL21 (DE3), tiene una copia del gen de la RNA polimerasa T7 bajo el control del promotor lacUV5, inducible al adicionar un análogo no metabolizable de la lactosa como el Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) al medio; de esta manera el represor del promotor lacUV5 se libera y se transcribe la RNA polimerasa T7, que a su vez reconoce el promotor T7 en el vector (pET28), comenzando

a sí la transcripción del ADNc de la EndoG por la RNA polimerasa T7, generándose la expresión de la proteína.

7.4 PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES *E. coli* BL21 (DE3) POR CLORURO DE RUBIDIO

Se tomó un inoculo de células *E. coli* BL21 (DE3) y se puso a crecer en 5ml de medio LB (Luria Bertani) fresco por 15 horas aproximadamente con agitación a 37°C (Environ Shaker). Teniendo el cultivo saturado se tomó 1ml para inocular 100 ml de medio LB fresco, dejándolo en agitación a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm de absorbancia entre 0.4 (se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro Thermo spectronic Genesys 10UV). En este punto, se tomó el cultivo y se centrifugó a 4500rpm por 5min a 4°C (centrifuga HERMLE ZX401). El sedimento se resuspendió en 40ml de buffer I (Acetato de Potasio 300mM, Cloruro de Rubidio 100mM, Cloruro de Calcio 10mM, Cloruro de Magnesio 5mM, Glicerina 15% (v/v), pH. 5.8), dejándolas bacterias por 5min a 4°C. Pasados los 5min se centrifugó nuevamente a 4500rpm por 5 min a 4°C (centrifuga HERMLE ZX401). El sedimento se resuspendió en 10ml de buffer II (MOPS 10mM, Cloruro de Rubidio 10mM, Cloruro de Calcio 75mM, Glicerina 15% (v/v) a pH: 6.5). Las células fueron guardadas en viales de 1.5ml, congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C.

7.5 TRANSFORMACIÓN

Una alícuota de células *E. coli* competentes BL21 (DE3) se descongeló en hielo. A estas células se les agregó 10ng del ADN plasmídico que lleva el ADNc de la EndoG de *L. (V) panamensis* (pET28/EndoG), se mezcló y se incubó en hielo por 30min. Después la mezcla (plásmido/*E. coli*) se incubó a 42°C por 1min (choque térmico) en un baño maría. Luego del choque térmico la mezcla se incubó en hielo durante 2min. Se le agregó 300µl de medio LB (Luria Bertani) sin antibióticos y la mezcla se incubó 1 hora a 37°C con agitación (Environ Shaker). Las bacterias transformadas se diseminaron en cajas de Petri con agar más 50µg/ml de Kanamicina (kan). Bacterias sin el ADN plasmídico se sembraron en platos de agar más 50µg/ml de kan como control negativo. Los platos se incubaron a 37°C por 18 horas en un calentador (Heater Cenco), al

término de las cuales crecieron las colonias de las bacterias transformadas, ósea, aquellas bacterias que incorporaron en ADN plasmídico (pET28/EndoG).

7.6 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE EndoG DE *L. (V) panamensis*

Se tomó una colonia resultante del plato de agar y se transfirió a 100ml de medio LB con 50µg/ml de kan y se incubó a 37°C con agitación toda la noche (Environ Shaker). Al día siguiente, se tomaron los 100ml del cultivo para inocular 900ml de medio fresco con 50µg/ml de kan. Los frascos se incubaron a 37°C con agitación hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0.5-0.6 a una absorbancia de 600nm (espectrofotómetro Thermo spectronic Genesys 10UV). En este punto, se sacó una alícuota de 1ml sin inducción. Luego se le agregó a cada frasco de cultivo IPTG a una concentración final de 1mM para inducir la expresión de la proteína. La inducción se continuó, dejando los frascos en incubación por 3 horas adicionales a 37°C con agitación. Se tomaron alícuotas igualmente de 1ml a la hora, a las dos horas y a las tres horas para observar la expresión de la enzima EndoG. Las alícuotas se centrifugaron a 13000 rpm (Microcentrifuge Heraeus Biofuge Fresco) por 1min y el precipitado se resuspendió en 100µl de Buffer SDS 1X [SDS al 10% (p/v), 10mM beta-mercapto etanol (β -ME) (v/v), glicerol 20% (v/v), 0.2M Tris-HCl pH: 6.8, 0.05% (p/v)], las muestras se calentaron a 94°C por 1min. La expresión se observó por electroforesis SDS-PAGE al 12%, teñido con azul de coomassie. Las bacterias se colectaron por centrifugación a 6000 rpm (centrifuga HERMLE ZX401) por 15min a 4°C.

Las bacterias centrifugadas se resuspendieron en un buffer de lisis frío TBSE (10 mM Tris-HCl, pH: 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA y 1% de β -ME). Las células fueron lisadas por ultrasonido (Sonicación, sonicador Sonics vibra cell VCX 130) a 204 watts por 5min a 4°C. Luego de la sonicación, se centrifugó por 30min a 11500 rpm (centrifuga HERMLE ZX401) a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se descartó y los cuerpos de inclusión (CI) donde se encuentra la proteína EndoG se lavaron en 30 volúmenes de buffer TBSE (p/v) y 10 volúmenes de buffer 8M GuHCl (p/v) (Condiciones desnaturizantes), la solución se dejó en agitación suave por 30min a temperatura ambiente. Después de transcurrido el tiempo, se centrifugó nuevamente 30min a 11500 rpm a 4°C. Los CI finalmente se solubilizaron con 4 volúmenes de

buffer TE (p/v) (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, a pH: 8.0) y 5 volúmenes de buffer 8M GuHCl (p/v) y 100µl β-MET. Esta solución se incubó toda la noche a temperatura ambiente con agitación. Al día siguiente, la solución se centrifugó por 90min a 15000 rpm a 4°C. El sobrenadante se filtró con filtros de papel (Whatman 70mm c/100) por gravedad y posteriormente se cuantificó la proteína obtenida por densidad óptica a una absorbancia de 280nm (espectrofotómetro Thermo spectronic Genesys 10UV). La proteína fue concentrada en el sistema de ultra concentración AMICON utilizando membranas de celulosa YM3 con un poro de exclusión de tamaño de 3000 Da (MWCO 3000) a 20mg/ml (AMICON, Filtración y Análisis).

La purificación de EndoG se realizó por cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC). Se tomaron 40mg de proteína por cada 1ml de resina de níquel-Profinity (BIO RAD). Esta resina fue previamente empacada en columna plástica de BIO RAD. Como buffer de unión se preparó un buffer 6M GuHCl, 10mM imidazol, con el cual se equilibró la columna con 3 volúmenes de este buffer. Luego se cargo la proteína en la columna hasta la saturación de la resina, se colectó la fracción de proteína que no se alcanzó a unir a la resina. Los lavados se hicieron con 5 volúmenes de buffer 6M GuHCl, 25mM imidazol, igualmente se recogió la fracción de los lavados. La elución de la proteína EndoG que quedo unida a la resina profinity se realizó con 5 volúmenes del buffer de elución (6M GuHCl, 300mM imidazol). La purificación de la proteína EndoG se verificó por SDS-PAGE al 12% teñido con azul de coomassie. Las fracciones con mayor cantidad de proteína y que mostraban una sola banda (pureza) fueron reunidas en un pool y concentradas nuevamente a 20mg/ml (AMICON, Filtración y Análisis).

7.7 RENATURALIZACIÓN Y DIÁLISIS DE LA EndoG DE *L. (V) panamensis*

Como la proteína EndoG de *L. (V) panamensis* se expresa en forma desnaturalizada en los CI de *E.coli*, esta debe de ser renaturalizada después de ser purificada de la columna de Ni. Brevemente, de la proteína purificada se tomaron 25mg (1.25ml), que fueron diluidos en 250ml de buffer de renaturalización (100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 0.4mM KCl, 2.0M Urea, 0.05% Tritón X-100, 0.1mM GSH y 0.01mM GSSH, a pH: 8.0). La mezcla se incubó a 4°C toda la noche con agitación suave (50 rpm). Al día

siguiente la proteína se envasó en membranas de celulosa Spectra/Por para la diálisis (Spectra/Por Dialysis Membrane MWCO: 3,550), las membranas se sumergieron en un recipiente con 2.5L de buffer de diálisis (100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 0.4mM KCl, 1 M Urea, 0.05% Tritón X-100, 0.1mM GSH y 0.01mM GSSH, a pH: 8.0) por 24 horas, y para finalizar se hizo un nuevo cambio de buffer de diálisis (100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 0.4mM KCl, 0.05% Tritón X-100, 0.1mM GSH y 0.01mM GSSH, a pH: 8.0) sin urea, dejándolo 24 horas más. Al término de las 48 horas de la diálisis, la EndoG fue concentrada en el sistema de ultrafiltración AMICON utilizando membranas de celulosa YM3 con un poro de exclusión de tamaño de 3000 Da (MWCO 3000) a 2mg/ml (AMICO Filtración y Análisis). La proteína EndoG renaturalizada se cargó en una columna con resina de níquel nueva (Profinity de BIO RAD) previamente equilibrada con el mismo buffer donde esta la EndoG renaturalizada (100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 0.4mM KCl, 0.05% Tritón X-100, 0.1mM GSH y 0.01mM GSSH, a pH: 8.0) adicionando 10mM de imidazol. Teniendo unida la proteína a la resina, la columna se lavó dos veces con el mismo buffer suplementado con 25mM imidazol. La EndoG renaturalizada fue eluida de la columna por medio de un aumento en la concentración del imidazol hasta 300mM en el buffer de renaturalización. La concentración de la proteína se calculó midiendo la densidad óptica a 280nm (Thermo spectronic Genesys 10UV). La pureza de la EndoG renaturalizada se evaluó en SDS-PAGE AL 12% teñido con azul de coomassie. La proteína EndoG purificada y concentrada a 3.3mg/ml fue empleada en los posteriores ensayos de actividad y cristalización

7.8 PRUEBA DE ACTIVIDAD ENDONUCLEASA DE LA EndoG DE *L. (V) panamensis*

La actividad endonucleasa de la EndoG previamente renaturalizada se evaluó digiriendo ADN genómico humano. El buffer de reacción que se utilizó fue el buffer Tango 1X (Fermentas, 33mM Tris-Acetato pH: 7.9, 10mM Acetato de Magnesio, 66mM Acetato de Potasio, 0.1mg/ml BSA). Un microgramo de ADN humano se incubó con 0.5µg, 1µg y 1.5µg de la enzima EndoG previamente renaturalizada, por 60 min a 37°C (en un Termociclador Perkin Elmer 9600). Al mismo tiempo se hizo la reacción de los controles negativos: control 1, sin endonucleasa EndoG, control 2, con 2µg de EndoG en 6M GuHCl, con las mismas condiciones de las reacciones anteriores.

La prueba de inhibición de la actividad endonucleasa de EndoG se realizó utilizando iones de potasio como inhibidor de acuerdo a publicaciones recientes (Toro, et al., 2011) . La reacción de inhibición se realizó utilizando 2µg ADN humano con 2µg de EndoG renaturalizada en presencia 150mM ó 200mM de cloruro de potasio KCl, la reacción se incubó a las condiciones previamente descritas. El volumen final de cada reacción fue de 20µl. La reacción se detuvo incubando las muestras a 85°C por 30min. La digestión del ADN se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñidas con bromuro de etidio (BrEt).

7.9 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

Se hizo el análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos reportadas en la base de datos del NCBI Protein, que corresponden a los números de acceso XP_001681394.1 para la EndoG de *L. major*, ABY89724.1 para la EndoG de *L. infantum*, ACR81578.1 para la EndoG de *L. braziliensis*, ACR81579.1 para la EndoG de *L. panamensis* y NP_610737.1 para la EndoG de *D. melanogaster*, utilizando ClustalW2 para hacer el alineamiento. Y la visualización se hizo por Jalview.

7.10 CRISTALIZACIÓN DE LA EndoG DE *L. (V) panamensis*

La cristalización de la proteína EndoG se realizó por el método de la gota colgante (Hanging Drop), para el cual se utilizó el kit de cristalización Hampton Research Screen HR2-110 (**Tabla 2**). En los platos de cristalización de 24 pozos se depositaron 500µl de buffer/pozo (Multiwell 24 well Falcon) como buffer reservorio. Luego, se tomaron 0.5, 1.0 y 2µl de proteína EndoG a una concentración de 3.3mg/ml se mezclaron con 1µl de solución madre sobre un vidrio circular siliconado (Ø22) (Hampton Research Siliconized Glass HR3-231 22mm). Teniendo la gota en el vidrio y el buffer reservorio en el pozo, este se selló con grasa de silicona, dejando los platos a temperatura ambiente (**Figura 2**). El crecimiento de los cristales se observó 72 horas utilizando un microscopio óptico (Carl Zeiss Jena microscope) con lentes de 10X y 40X. Además de observar los cristales bajo luz polarizada utilizando el microscopio Nikon en 10X y 40X.

BUFFERS DE CRISTALIZACIÓN HAMPTON RESEARCH SCREEN HR2-110

Tubo	Sal	Tubo	Buffer	Tubo	Precipitante
1.	0.02 M Cloruro de calcio di-hidratado	1.	0.1 M Acetato de sodio tri-hidratado pH 4.6	1.	30% v/v (+/-)-2-Metil-2,4-pentanediol
2.	No	2.	No	2.	0.4 M Tartrato de sodio potasio tetra-hidratado
3.	No	3.	No	3.	0.4 M Fosfato de amonio monobásico
4.	No	4.	0.1 M TRIS hidrocloreuro pH 8.5	4.	2.0 M Sulfato de amonio
5.	0.2 M Citrato de sodio tribásico di-hidratado	5.	0.1 M HEPES sodio pH 7.5	5.	30% v/v (+/-)-2-Metil-2,4-pentanediol
6.	0.2 M Cloruro de magnesio hexa-hidratado	6.	0.1 M TRIS hidrocloreuro pH 8.5	6.	30% p/v Polietilenglicol 4,000
7.	No	7.	0.1 M Cacodilato de sodio tri-hidratado pH 6.5	7.	1.4 M Acetato de sodio tri-hidratado
8.	0.2 M Citrato de sodio tribásico di-hidratado	8.	0.1 M Cacodilato de sodio tri-hidratado pH 6.5	8.	30% v/v 2-Propanol
9.	0.2 M Acetato de amonio	9.	0.1 M Citrato de sodio tribásico di-hidratado pH 5.6	9.	30% p/v Polietilenglicol 4,000
10.	0.2 M Acetato de amonio	10.	0.1 M Acetato de sodio tri-hidratado pH 4.6	10.	30% p/v Polietilenglicol 4,000
11.	No	11.	0.1 M Citrato de sodio tribásico di-hidratado pH 5.6	11.	1.0 M Fosfato de amonio monobásico
12.	0.2 M Cloruro de magnesio hexa-hidratado	12.	0.1 M HEPES sodio pH 7.5	12.	30% v/v 2-Propanol
13.	0.2 M Citrato de sodio tribásico di-hidratado	13.	0.1 M TRIS hidrocloreuro pH 8.5	13.	30% v/v Polietilenglicol 400
14.	0.2 M Cloruro de calcio di-hidratado	14.	0.1 M HEPES sodio pH 7.5	14.	28% v/v Polietilenglicol 400
15.	0.2 M Sulfato de amonio	15.	0.1 M Cacodilato de sodio tri-hidratado pH 6.5	15.	30% p/v Polietilenglicol 8,000
16.	No	16.	0.1 M HEPES sodio pH 7.5	16.	1.5 M Sulfato de litio mono-hidratado
17.	0.2 M Sulfato de litio mono-hidratado	17.	0.1 M TRIS hidrocloreuro pH 8.5	17.	30% p/v Polietilenglicol 4,000
18.	0.2 M Acetato de magnesio tetra-hidratado	18.	0.1 M Cacodilato de sodio tri-hidratado pH 6.5	18.	20% p/v Polietilenglicol 8,000
19.	0.2 M Acetato de amonio	19.	0.1 M TRIS hidrocloreuro pH 8.5	19.	30% v/v 2-Propanol
20.	0.2 M Sulfato de amonio	20.	0.1 M Acetato de sodio tri-hidratado pH 4.6	20.	25% p/v Polietilenglicol 4,000
21.	0.2 M Acetato de magnesio tetra-hidratado	21.	0.1 M Cacodilato de sodio tri-hidratado pH 6.5	21.	30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
22.	0.2 M acetato de sodio tri-hidratado	22.	0.1 M TRIS hidrocloreuro pH 8.5	22.	30% p/v Polietilenglicol 4,000
23.	0.2 M Cloruro de magnesio hexa- hidratado	23.	0.1 M HEPES sodio pH 7.5	23.	30% v/v Polietilenglicol 400
24.	0.2 M Cloruro de calcio di-hidratado	24.	0.1 M Acetato de sodio tri-hidratado pH 4.6	24.	20% v/v 2-Propanol
25.	No	25.	0.1 M Imidazol pH 6.5	25.	1.0 M Acetato de sodio tri-hidratado
26.	0.2 M Acetato de amonio	26.	0.1 M Citrato de sodio di-	26.	30% v/v (+/-)-2-Methyl-

Expresión, Purificación y Cristalización de la Endonucleasa G (EndoG) de *Leishmania (Viannia) panamensis* como una Primera Aproximación a los Estudios Estructurales de Proteínas

27.	0.2 M Citrato de sodio di-hidratado	27.	0.1 M HEPES sodio pH 7.5	27.	2,4-pentanediol 20% v/v 2-Propanol
28.	0.2 M Acetato de sodio tri-hidratado	28.	0.1 M Cacodilato de sodio tri-hidratado pH 6.5	28.	30% p/v Polietilenglicol 1 8,000
29.	No	29.	0.1 M HEPES sodio pH 7.5	29.	0.8 M Tartrato de sodio tetra-hidratado
30.	0.2 M Sulfato de amonio	30.	No	30.	30% p/v Polietilenglicol 8,000
31.	0.2 M Sulfato de amonio	31.	No	31.	30% p/v Polietilenglicol 4,000
32.	No	32.	No	32.	2.0 M Sulfato de amonio
33.	No	33.	No	33.	4.0 M Formiato de sodio
34.	No	34.	0.1 M Acetato de sodio tri-hidratado pH 4.6	34.	2.0 M Formiato de sodio
35.	No	35.	0.1 M HEPES sodio pH 7.5	35.	0.8 M Fosfato de amonio monobásico
36.	No	36.	0.1 M TRIS hidrocloreuro pH 8.5	36.	0.8 M Fosfato de potasio monobásico
37.	No	37.	0.1 M Acetato de sodio tri-hidratado pH 4.6	37.	8% p/v Polietilenglicol 8,000
38.	No	38.	0.1 M HEPES sodio pH 7.5	38.	8% p/v Polietilenglicol 4,000
39.	No	39.	0.1 M HEPES sodio pH 7.5	39.	1.4 M Citrato de sodio tribásico di-hidratado
40.	No	40.	0.1 M Citrato de sodio tribásico di-hidratado pH 5.6	40.	2% v/v Polietilenglicol 400
41.	No	41.	0.1 M HEPES sodio pH 7.5	41.	2.0 M Sulfato de amonio
42.	0.05 M Fosfato de potasio monobásico	42.	No	42.	20% v/v 2-Propanol
43.	No	43.	No	43.	20% p/v Polietilenglicol 4,000
44.	No	44.	No	44.	10% v/v 2-Propanol
45.	0.2 M acetato de Zinc di-hidratado	45.	0.1 M Cacodilato de sodio tri-hidratado pH 6.5	45.	20% p/v Polietilenglicol 4,000
46.	0.2 M Acetato de sodio hidratado	46.	0.1 M Cacodilato de sodio tri-hidratado pH 6.5	46.	20% p/v Polietilenglicol 8,000
47.	No	47.	0.1 M Acetato de sodio tri-hidratado pH 4.6	47.	30% p/v Polietilenglicol 1,500
48.	No	48.	0.1 M TRIS hidrocloreuro pH 8.5	48.	0.2 M Formiato de magnesio di-hidratado
49.	1.0 M Sulfato de litio mono-hidratado	49.	No	49.	18% p/v Polietilenglicol 8,000
50.	0.5 M Sulfato de litio mono-hidratado	50.	No	50.	18% p/v Polietilenglicol 8,000

Tabla 2. Buffers de Cristalización (Hampton Research Screen HR2-110). Composición de las 50 soluciones madre utilizadas para la cristalización de la EndoG de *L. (V) panamensis*.

8. RESULTADOS

8.1 INDUCCIÓN DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA EndoG DE *L. (V) panamensis*

La proteína EndoG de *L. (V) panamensis* se clonó en el vector de expresión pET28 (Novagen), el ADNc de EndoG fue ligado en este vector entre los sitios de restricción Bam H1 y Xho I (vector fue donado por el Dr. Juan Fernando Álzate, Grupo de Parasitología, Universidad de Antioquia). En la **Figura 3** se observa el direccionamiento del ADNc de EndoG en pET28, como también la secuencias que codifican para las colas de histidinas (His-tag) utilizadas en la purificación de la proteína EndoG y el gen de resistencia a Kanamicina (kan^r) para la selección de las células transformadas.

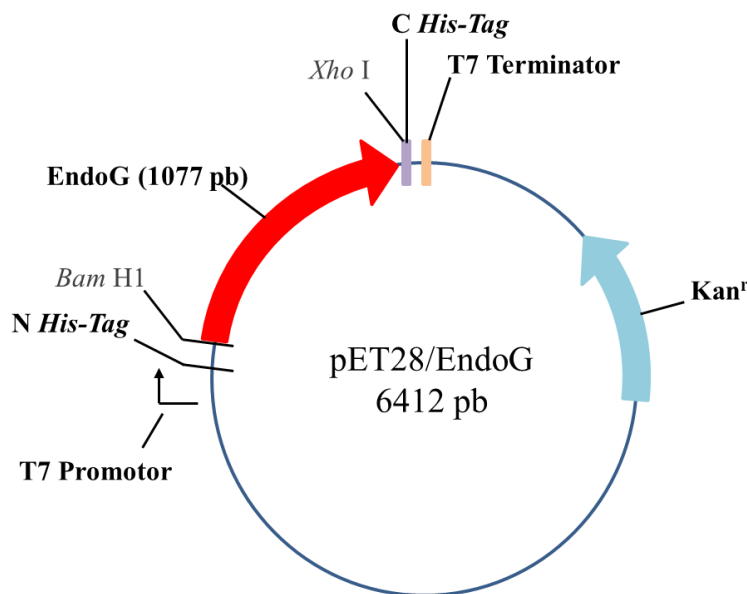


Figura 3. Representación Esquemática del Vector de Expresión pET28/EndoG. Orientación del fragmento clonado **EndoG (1077 pb)**. Ubicación de ambos sitios de restricción utilizados *Bam HI* y *Xho I*. Secuencias codificadas en el vector para las colas de histidina **N terminal (N His-Tag)** y **C terminal (C His-Tag)**, utilizadas en la purificación de la proteína EndoG por IMAC. Dirección de la secuencia promotora que es reconocida por la T7 polimerasa, **T7 Promotor** y **T7 Terminador**. Secuencia que codifica el gen de resistencia a kanamicina **Kan^r**. Tamaño total del vector de expresión utilizado pET28/EndoG es 6412pb

El ADNc clonado en pET28 que codifica para la EndoG de *L. (V) panamensis* está identificado en el Genbank con el número de acceso: GQ119624.1 (**Figura 4**, secuencia de nucleótidos del ADNc y aminoácidos de la proteína EndoG de *L. (V) panamensis*). La secuencia de nucleótidos del ADNc de EndoG comprende 1077, lo que representa una proteína de 359 aminoácidos, mas 42 aminoácidos que pertenecen al vector pET28, lo que resulta en una proteína de un tamaño final de 401 residuos y con un tamaño esperado de 43.4kDa (**Figura 4**, cuadro inferior)

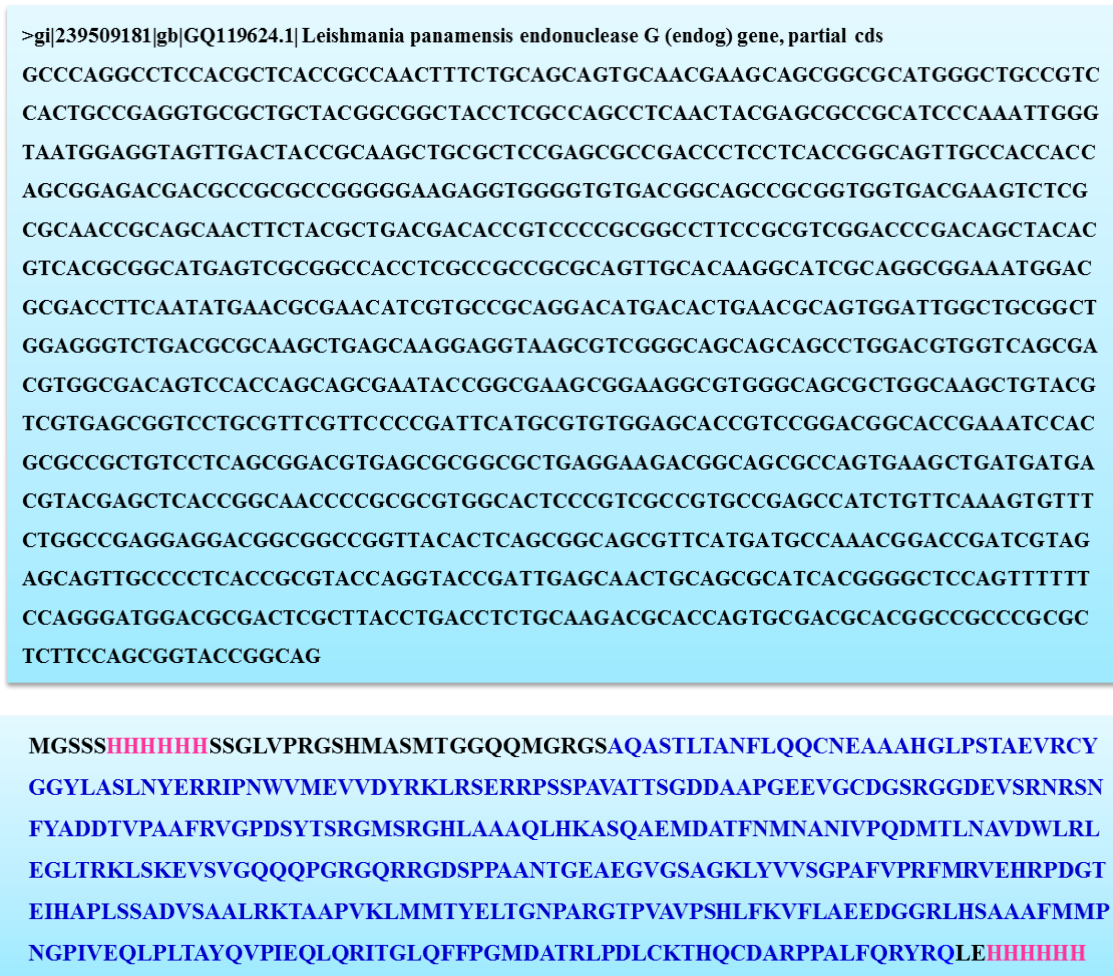


Figura 4. Secuencia de Nucleótidos y Aminoácidos de la EndoG de *L. (V) panamensis*. La secuencia de nucleótidos en formato FASTA tiene el número de acceso en Genbank GQ119624.1 (cuadro superior). La secuencia de aminoácidos de la EndoG se muestra en color azul (cuadro inferior); en color negro y magenta están los aminoácidos que pertenecen al vector pET28 y que se expresan con la proteína EndoG.

Para la expresión de la EndoG recombinante se utilizó la cepa de *E. coli* B121 (DE3). Las células fueron transformadas con el plásmido pET28/EndoG (Metodología 7.5). De las colonias obtenidas, se tomó una para hacer los cultivos preparativos para inducir la expresión de EndoG. La inducción de EndoG con IPTG se realizó por 3 horas tomando alícuotas de 1ml/hora. Por 1L de cultivo inducido se obtuvo un sedimento de 4g de peso húmedo de bacterias. La producción de la proteína se verificó por medio de SDS-PAGE al 12%. La proteína EndoG que tiene un peso molecular de 43,4kDa, migra entre las bandas de 55kDa y 36kDa del marcador de peso molecular (**Figura 5**). Así mismo, en la **Figura 5** vemos que no hay diferencias significativas al dejar el cultivo hasta las 3 horas de inducción, pues el tamaño de la banda que corresponde a EndoG en las muestras 4 (2 horas) y muestra 5 (3 horas) no aumentó en el tiempo a partir de las dos horas de inducción. Por esta razón para los cultivos siguientes el tiempo de inducción fue realizado por 2 horas.

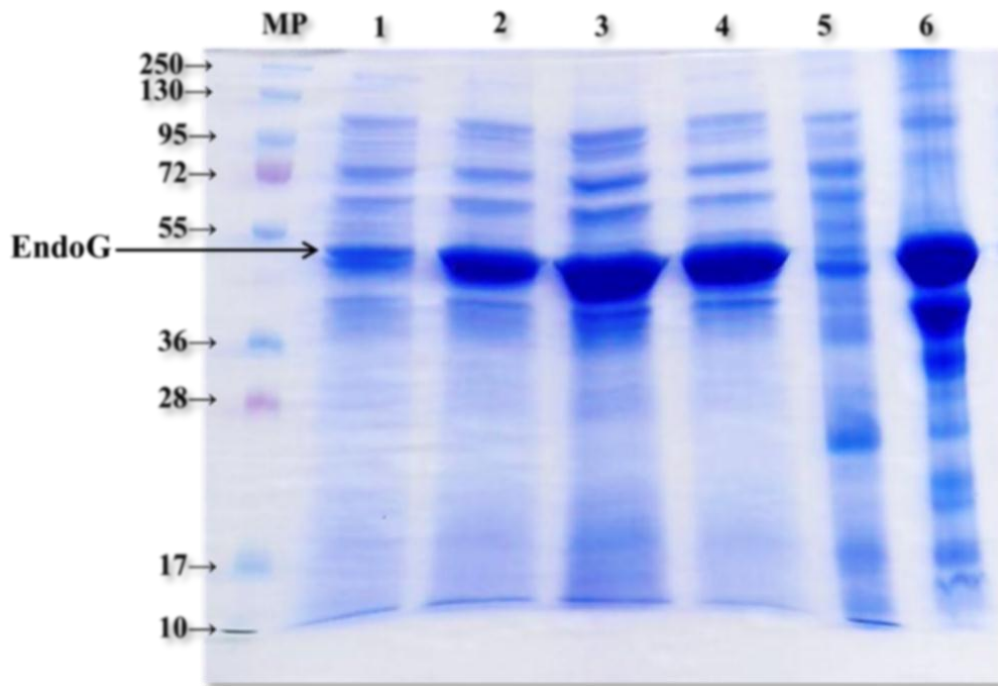


Figura 5. Inducción de la Proteína EndoG y Prueba de Solubilidad de la Proteína. Marcador de peso molecular (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 10-250kDa, Thermo scientific). **1)** Sin inducción. **2)** 1 hora de inducción. **3)** 2 horas de inducción. **4)** 3 horas de inducción. **5)** Sobrenadante (proteínas solubles). **6)** Sedimento (cuerpos de inclusión: proteínas insolubles)

Después de la expresión de la proteína EndoG, las bacterias fueron lisadas por sonicación para obtener los cuerpos de inclusión en la fracción insoluble (sedimento) y un sobrenadante. Luego de la sonicación, se obtuvo el peso de los cuerpos de inclusión que fue de 1.2g, y este peso se redujó a 1.0g peso húmedo después los lavados. Los cuerpos de inclusión corresponden aproximadamente al 25% del peso del total de bacterias (**Tabla 3**).

Producción de Proteína EndoG de <i>L. (V) panamensis</i>	
Cultivo de bacterias (g/1 Litro)	4.0
Cuerpos de inclusión (g/1 Litro)	1.2
Cuerpos de inclusión después de los lavados (g/1 Litro)	1.0
Renaturalización (mg)	25
Proteína activa después de la purificación (mg)	16.5

Tabla 3. Producción de la Proteína EndoG *L. (V) panamensis*. Se muestra el rendimiento por litro de cultivo inducido. Peso húmedo del sedimento de bacterias. Peso húmedo de cuerpos de inclusión antes de los lavados y después de los lavados. Proteína que se renaturalizó y cantidad de proteína activa purificada.

Se tomaron alícuotas de 100µl de cada uno, cuerpos de inclusión y sobrenadante, para verificar en cual de ellos se encontraba la EndoG, estas muestras también fueron analizadas por SDS-PAGE al 12% (**Figura 5**). El resultado muestra que la EndoG está en los cuerpos de inclusión. La proteína EndoG presente en los cuerpos de inclusión se solubilizó utilizando agentes caotrópicos como cloruro de guanidinio (GuHCl) y urea, en concentraciones altas de 8M y 6M (**Figura 6**). Se puede observar que en los cuerpos de inclusión están presentes otras proteínas. El promedio de obtención de proteína total/por litro de cultivo inducido fue 55mg. Como se puede apreciar visualmente en la **Figura 6**, más del 80% de la proteína presente en los cuerpos de inclusión es EndoG. Utilizando el sistema de ultra concentración AMICON la proteína se llevo a una concentración final de 20mg/ml.

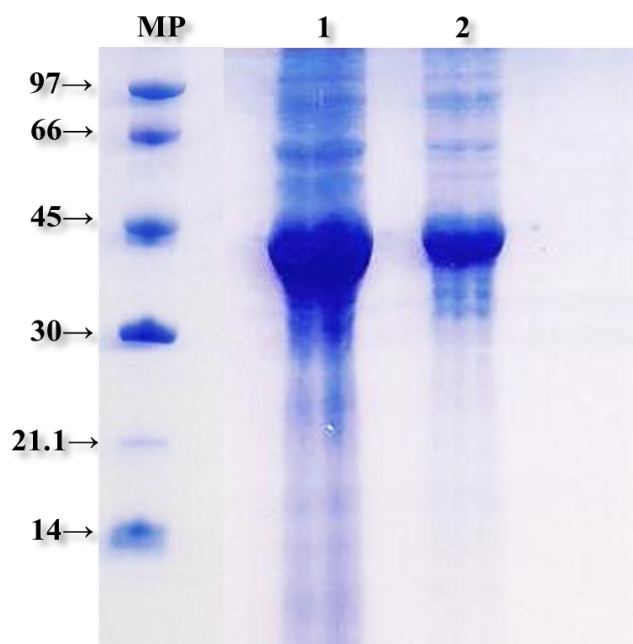


Figura 6. Proteína EndoG Extraída de Cuerpos de Inclusión por Agente Desnaturalizante 8M GuHCl. Marcador de peso molecular (Amersham, LMW Calibration kit for SDS electroforesis). 1) Cuerpos de inclusión antes de la lisis. 2) Proteína extraída de cuerpos de inclusión con el agente desnaturalizante 8M GuHCl.

8.2 ELIMINACIÓN DE PROTEÍNAS CONTAMINANTES DE LA EndoG DE *L. (V) panamensis* PRESENTES EN CUERPOS DE INCLUSIÓN DE *E. coli*

La purificación de EndoG se efectuó por IMAC, teniendo en cuenta que la proteína EndoG expresada en pET28 quedó marcada con dos colas de histidinas en los extremos amino-carboxilo terminal, la purificación se hizo utilizando la resina de níquel-Profinity (BIO RAD). Para saturar la columna, se utilizó 1ml de resina de níquel-Profinity por cada 40mg de proteína en GuHCl. (**Figura7**). Proteínas diferentes de EndoG y que se unieron a la columna, fueron lavadas utilizando buffer de lavado con 25mM de imidazol. Para la elución de la proteína EndoG unida a la resina, se aumentó la concentración del imidazol hasta 300mM, colectando las fracciones inmediatamente después de cambiado el buffer (**Figura 7**).

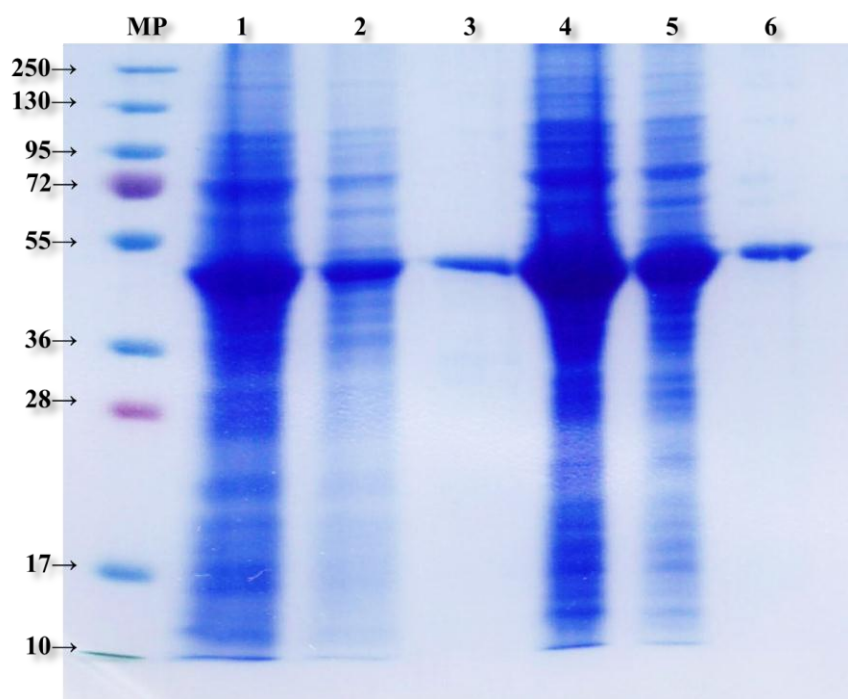


Figura 7. Purificación de EndoG por IMAC. Marcador de peso molecular (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 10-250kDa, Thermo scientific). **1 y 4)** Proteína EndoG que no se unió a la resina. **2 y 5)** Lavado 25mM imidazol. **3 y 6)** Elución 300mM imidazol. Se presentan dos experimentos independientes: 1-3 y 4-6.

Por cada 40mg de proteína que está en 8M GuHCl sin purificar se lograron recuperar en promedio 4mg de proteína EndoG purificada, esto equivale al 10% en el rendimiento en cada purificación. Las fracciones obtenidas en cada purificación se unieron en un solo pool y la proteína fue nuevamente concentrada a 20mg/ml para utilizarla en los ensayos de renaturalización.

8.3 RENATURALIZACIÓN DE LA EndoG DE *L. (V) panamensis*

Se tomaron 1.25 μ l del pool purificado por IMAC (25mg de proteína EndoG desnaturalizada) se agregaron a 250ml de buffer de renaturalización con una concentración de 2M de urea (Metodología 7.7). La concentración de la urea se fue reduciendo por medio de diálisis hasta llegar a cero y así permitir un plegamiento gradual de la proteína EndoG. El buffer para la renaturalización de EndoG constaba de un sistema redox por la presencia de glutatión reducido (GSSH) y glutatión oxidado

(GSH). Después de la diálisis, la EndoG fue concentrada a 3.3mg/ml (5ml). Nuestros resultados muestran que a esta concentración EndoG permanece en solución utilizando el buffer 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 0.4mM KCl, 0.05% Tritón X-100, 0.1mM GSH y 0.01mM GSSH, a pH: 8.0. A concentraciones mayores de 3.3mg/ml la proteína comienza a precipitarse. La EndoG renaturalizada se cargó nuevamente en la columna de níquel-Profinity (Metodología 7.7) para eliminar los posibles contaminantes aun presentes. La columna se lavó con el mismo buffer suplementado con 25mM de imidazol. La interacción de la proteína EndoG y la resina de Ni se sustituyó incrementando la concentración de imidazol hasta 300mM. Las fracciones obtenidas con el buffer de elución se analizaron en un gel SDS-PAGE al 12%, (**Figura 8**).

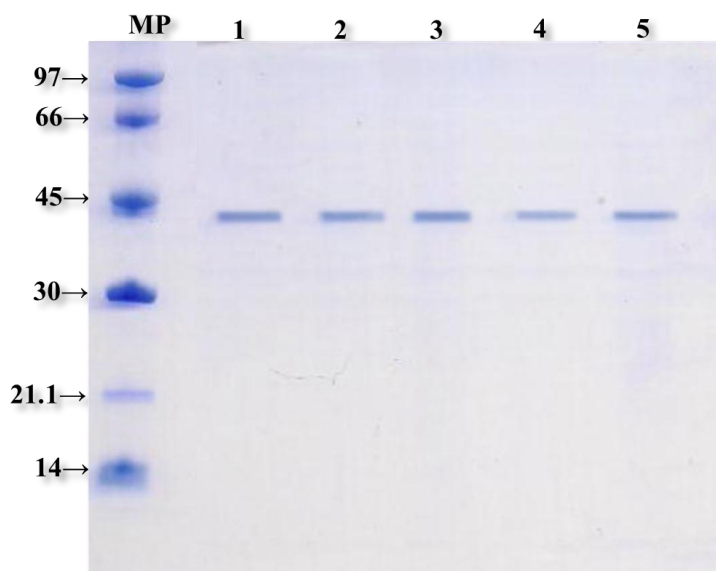


Figura 8. Proteína EndoG Renaturalizada. Se muestran 5 experimentos independientes de purificación de la proteína EndoG luego de la renaturalización. Se corrieron aproximadamente 1µg en cada carril. Marcador de peso molecular (Amersham, LMW Calibration kit for SDS electroforesis). **1)** fracción 1 renaturalizada. **2)** fracción 2 renaturalizada. **3)** fracción 3 renaturalizada. **4)** fracción 4 renaturalizada. **5)** fracción 5 renaturalizada.

Como se puede ver en el gel, la proteína EndoG eluida de la columna de Ni tiene una pureza aproximada de mas del 90%, ya que se observa una solo banda en fracciones corridas en el SDS-PAGE y teñido con azul de coomassie. Nuestros resultados muestran, que de 25mg de proteína que se renaturalizó, se purificaron 16.5mg de proteína EndoG en un volumen total de 15ml. Para obtener la concentración final de trabajo encontrada de 3.3 mg/ml, el pool de fracciones se concentró a un volumen final

de 5ml. Esta proteína fue utilizada en los experimentos de actividad endonucleasa y posteriormente de cristalización.

8.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENDONUCLEASA DE LA EndoG DE *L. (V) panamensis*

Para corroborar que la renaturalización de EndoG fue exitosa logrando recobrar la función endonucleasa, se hizo la prueba de digestión de ADN genómico humano. Para cada reacción se utilizó el buffer Tango de fermentas (33mM Tris –acetato pH: 7.9, 10mM acetato de Magnesio, 66mM acetato de Potasio, 0.1mg/ml BSA) a una concentración final de 1X. La prueba de actividad endonucleasa fue realizada a una temperatura de 37°C por 60min en todas las reacciones (**Tabla 4**).

ACTIVIDAD ENDONUCLEASA							
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7
	C1(-)	C2(-)	3	4	5	Inhibidor	Inhibidor
EndoG (Renaturalizada)	No	No	0.5µg	1µg	1.5µg	2µg	2µg
EndoG (Desnaturalizada)	No	2µg	No	No	No	No	No
Buffer Tango 10X	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl
ADN	1µg	1µg	1µg	1µg	1µg	2µg	2µg
KCl 2M	No	No	No	No	No	1.5µl	2µl

Tabla 4. Prueba de Actividad Endonucleasa de la EndoG. Volumen final de cada reacción fue 20µl, tiempo de la reacción 60min a 37°C. Se hicieron 7 reacciones, en la tabla se muestra el contenido de cada uno de los tubos en cada reacción.

Los resultados muestran que en ausencia de enzima o con la enzima en 6M GuHCl (controles negativos) no hay degradación del ADN (**Figura 9**, carril 1 y 2). Para la EndoG renaturalizada se utilizaron tres concentraciones diferentes: 0.5µg, 1µg y 1.5µg (**Tabla 4**, Tubos 3, 4 y 5. **Figura 9**. Carriles 3, 4 y 5). La presencia de degradación de ADN se observa como un pequeño barrido (smear), mostrando que hay actividad endonucleasa a partir de 0.5µg de enzima EndoG. El aumentó de la concentración de

EndoG hasta 1.5µg lleva a una degradación casi total del ADN genómico. Estos resultados demuestran que nuestra enzima es activa y que el proceso de renaturalización de la enzima restauró su actividad endonucleasa.

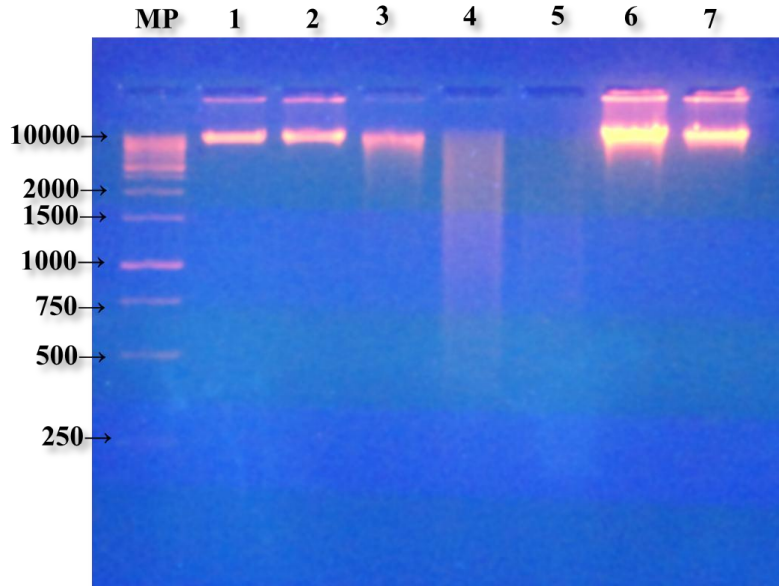


Figura 9. Actividad Endonucleasa de la EndoG. La reacción de digestión se incubó 37°C por 60min. La reacción se analizó en un gel de agarosa al 1.5%. Marcador de peso molecular de 1kb Fermentas. **1)** sin EndoG. **2)** EndoG en 6M GuHCl. **3)** 0.5µg de EndoG renaturalizada. **4)** 1µg de EndoG renaturalizada. **5)** 1.5µg de EndoG renaturalizada. **6)** Inhibidor KCl 150mM con 2µg EndoG. **7)** Inhibidor KCl 200mM con 2µg EndoG.

La proteína EndoG es una enzima que usa cofactores como el magnesio Mg^{2+} para su funcionamiento, y de la misma manera se conoce que iones como K^{+} inhiben la actividad de EndoG (Toro, et al., 2011). Para comprobar esta inhibición se utilizaron dos concentraciones de KCl, 150mM y 200mM. Nuestros resultados muestran una completa inhibición de la actividad endonucleasa por el KCl, incluso a concentraciones mayores de enzima de las utilizadas en la digestión de ADN (2 µg) (**Figura 9**, carriles 6 y 7). Estos datos están en concordancia con los resultados recientemente publicados por Toro y colaboradores en los cuales muestran una inhibición de la actividad endonucleasa de EndoG en presencia de iones potasio (Toro, et al., 2011).

Los resultados anteriores muestran una endonucleasa activa, con la cual se realizaron los experimentos de cristalización como paso inicial en el camino de conocer la estructura de la enzima.

8.5 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

Se hizo la comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas EndoG reportadas en NCBI Protein, para las especies de *L. (L) major*, *L. (L) infantum*, *L. (V) braziliensis* y *L. (V) panamensis*, además de la EndoG reportada para *Drosophila melanogaster*, utilizando el software ClustalW2 y la visualización se hizo por software libre como Jalview (**Figura10**).

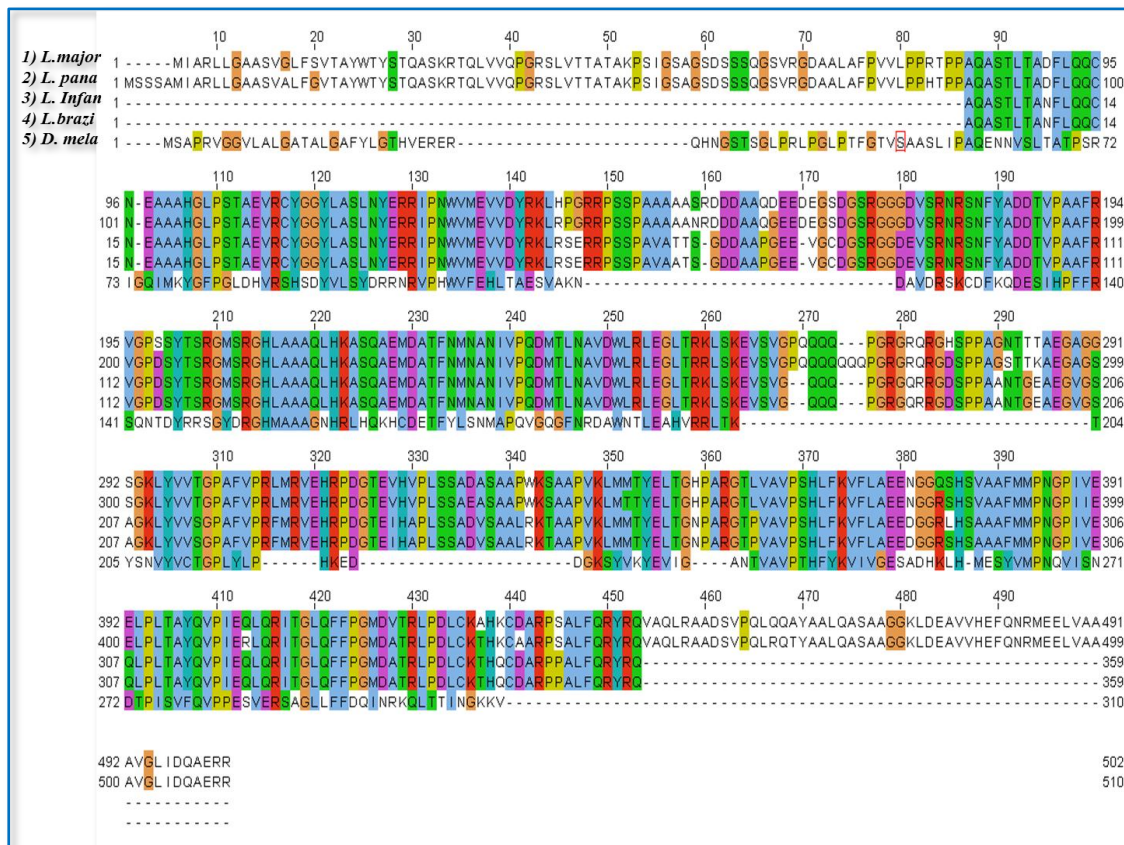


Figura 10. Alineamiento de las Secuencias de Aminoácidos de la Proteína EndoG. Las secuencias de los aminoácidos de EndoG de 4 especies de *Leishmania* y *Drosophila melanogaster* fueron comparadas utilizando Software Jalview. 1) *L. major*, 2) *L. panamensis* 3) *L. infantum*, 4) *L. braziliensis* y 5) *D. melanogaster*. Los colores representan los aminoácidos que se encuentran iguales entre las secuencias comparadas. Los espacios marcados por un guión hacen referencia a la secuencia donde no hay identidad entre ellas.

En la **Figura 10**, se muestra el alineamiento de las cinco secuencias, los colores representan los diferentes aminoácidos en los cuales coinciden las secuencias comparadas. Las secuencias que codifican para EndoG de *L. (L) major* y *L. (L) infantum* las cuales son dos especies *Leishmania* que pertenecen al subgénero *Leishmania*, tienen una identidad respecto a la EndoG de *L. (V) panamensis* que equivale a un 87% (**Tabla 5**). La identidad de la secuencia de la EndoG de *L. (V) braziliensis* frente a la secuencia de la EndoG de *L. (V) panamensis* corresponde a un 99%, ambas pertenecen al subgénero *Viannia*. Este resultado nos indica que hay diferencias entre los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*. Por otro lado, la identidad entre *L. major* y *L. infantum* es 95%.

Porcentaje de identidad en el alineamiento de secuencias de la proteína EndoG						
Sec A	Nombre	Longitud	Sec B	Nombre	Longitud	%
1	<i>L. major</i>	502	5	<i>D. melanogaster</i>	310	23
2	<i>L. panamensis</i>	359	5	<i>D. melanogaster</i>	310	23
3	<i>L. infantum</i>	510	5	<i>D. melanogaster</i>	310	23
4	<i>L. braziliensis</i>	359	5	<i>D. melanogaster</i>	310	23
1	<i>L. major</i>	502	2	<i>L. panamensis</i>	359	87
2	<i>L. panamensis</i>	359	3	<i>L. infantum</i>	510	87
3	<i>L. infantum</i>	510	4	<i>L. braziliensis</i>	359	87
1	<i>L. major</i>	502	4	<i>L. braziliensis</i>	359	88
1	<i>L. major</i>	502	3	<i>L. infantum</i>	510	95
2	<i>L. panamensis</i>	359	4	<i>L. braziliensis</i>	359	99

Tabla 5. ClustalW2 Análisis de Porcentaje de Identidad de las secuencias de aminoácidos de la Proteína EndoG. 1) *L. major*, 2) *L. panamensis*, 3) *L. infantum*, 4) *L. braziliensis* y 5) *D. melanogaster*.

Se puede advertir que hay una disminución en relación a la identidad entre las especies de los dos subgéneros de *Leishmania*, correspondiente a un 87%. Sin embargo, esta identidad es considerablemente alta, mostrando que la proteína EndoG es ampliamente conservada entre especies del género *Leishmania*. En contraste, vemos que la identidad concerniente a la EndoG reportada para *D. melanogaster* (que es la única Endonucleasa G a la cual se le conoce su estructura tridimensional (Loll, et al., 2009)), tuvo un valor de 23% al ser comparada con secuencias de EndoG propias de las especies de

Leishmania, **Figura 10**. En la última secuencia, correspondiente a la EndoG de *D. melanogaster*, pude notarse la disparidad entre los aminoácidos que concuerdan con las cuatro secuencias de las especies de *Leishmania*. Esta última comparación muestra una gran divergencia entre especies eucariotas, en una proteína que cumple al parecer una función similar en estos organismos.

8.6 CRISTALIZACIÓN

Teniendo la proteína EndoG purificada y corroborando que el proceso de renaturalización pudo plegar la proteína en su forma nativa recuperando su función, se procedió a hacer los ensayos cristalización por el método de gota colgante (Hanging Drop), en 50 diferentes buffer de cristalización (**Tabla 2**). La concentración EndoG empleada en la cristalización fue 3.3mg/ml. Tres relaciones diferentes EndoG/buffer de cristalización se ensayaron: 0.5:1, 1:1 y 2:1. La cristalización se llevó a cabo a temperatura ambiente (Medellín). Se evitó en gran medida perturbaciones que detuvieran el crecimiento de los cristales tales como movimientos, vibraciones, etc.

La primera lectura del crecimiento de los cristales se hizo a las 72 horas, donde se observaron algunas formas cristalinas además de precipitados de proteína y otras condiciones en las cuales no se observaba ningún resultado (gota clara) (**Figura 11**).

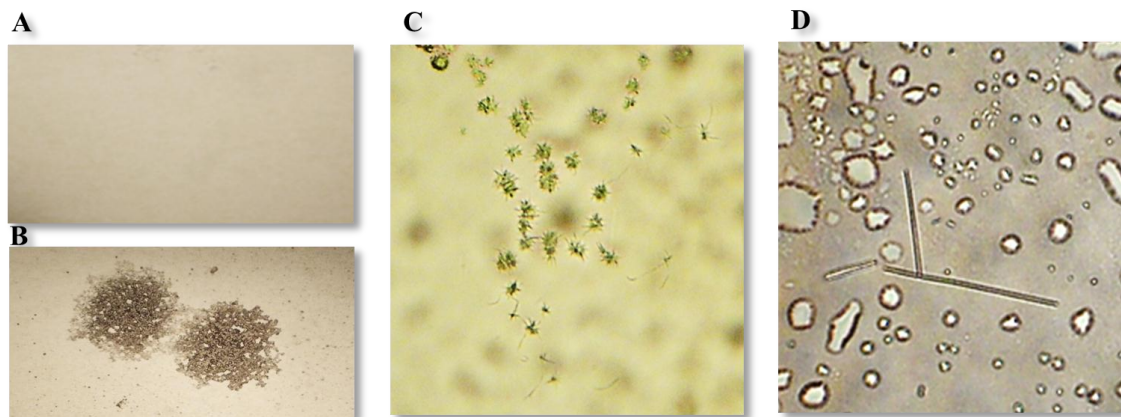


Figura 11. Comportamiento de la Proteína EndoG en los Diferentes Buffer de Cristalización. Se muestra el resultado de la cristalización de la proteína EndoG en algunos de los buffer de cristalización. **A)** Gota clara, no hay cambio en la solubilidad de EndoG. **B)** Precipitado, aglomeración de EndoG formando un sedimento. **C)** Esférulas, Son agujas muy delgadas agrupadas entorno a un sitio de nucleación, forma cristalina. **D)** Agujas, forma cristalina.

Las formas cristalinas son indicio de que el proceso de cristalización está ocurriendo, por esta razón, no se perturbo mas los cristales y se dejaron en resto de los días (12) hasta su evaluación final. En la **Figura 11**, están representadas las condiciones del comportamiento de la proteína en algunas de las soluciones madre utilizadas.

Relación (proteína/buffer)	Número	Buffer	Resultado (Cristales)
Ensayo 1	19	0.2M Acetato de Amonio, 0.1M Tri HCl pH: 8.5, 30% v/v 2-Propanol	Láminas
Ensayo 2	4	0.1M Tris-HCl pH: 8.5, 2.0M Sulfato de Amonio	Agujas
Ensayo 2	30	0.2M Sulfato de Amonio, 30% p/v PEG 8000	Esférulas
Ensayo 2	31	0.2M Sulfato de Amonio, 30% p/v PEG 4000	Láminas
Ensayo 2	39	0.1M Hepes Sodio pH: 7.5, 0.2% v/v PEG 400, 2.0M Sulfato de Amonio	Agujas y cilindros
Ensayo 2	40	0.1M Citrato de Sodio Tribásico di-hidratado pH: 5.6, 20% v/v 2-Propanol, 20% p/v PEG 4000	Láminas
Ensayo 2	47	2.0M Sulfato de Amonio, 0.2M Acetato de Sodio Tri-hidratado pH: 4.6	Agujas y Láminas
Ensayo 3	3	0.4M Fosfato de Amonio Monobásico	Rombos
Ensayo 3	47	0.1M Acetato de Sodio Tri-hidratado pH: 6.5	Agujas

Tabla 6. Formas Cristalinas y Cristales de la proteína EndoG. Las condiciones donde se obtuvieron cristales se evaluaron después de 15 días. Relación proteína/buffer, Ensayo (1): 0.5:1, Ensayo (2): 1:1, Ensayo (3): 2:1. El número hace referencia al buffer de cristalización (Tabla 2), composición del buffer y por último la forma cristalina o el cristal (es) que se obtuvo.

Con nuestros resultados pudimos constatar que el comportamiento de la proteína obedece a la relación proteína/buffer utilizada y la composición del buffer de cristalización (precipitantes, aditivos, etc). En la **Tabla 6**, se presentan las condiciones en las cuales se obtuvo cristales individuales. Los cristales en rombos fueron obtenidos en el ensayo 3, buffer de cristalización 3 (**Tabla 2**) (**Figura 12** y **Figura 13**), siendo la única condición donde se dio este resultado. En el ensayo 2, buffers 39 y 40 (**Tabla 2**)

se observaron cristales en láminas y cilindros, respectivamente. Las anteriores (buffers 3, 39 y 40) fueron las mejores condiciones de cristalización de la EndoG (**Figura 12**).

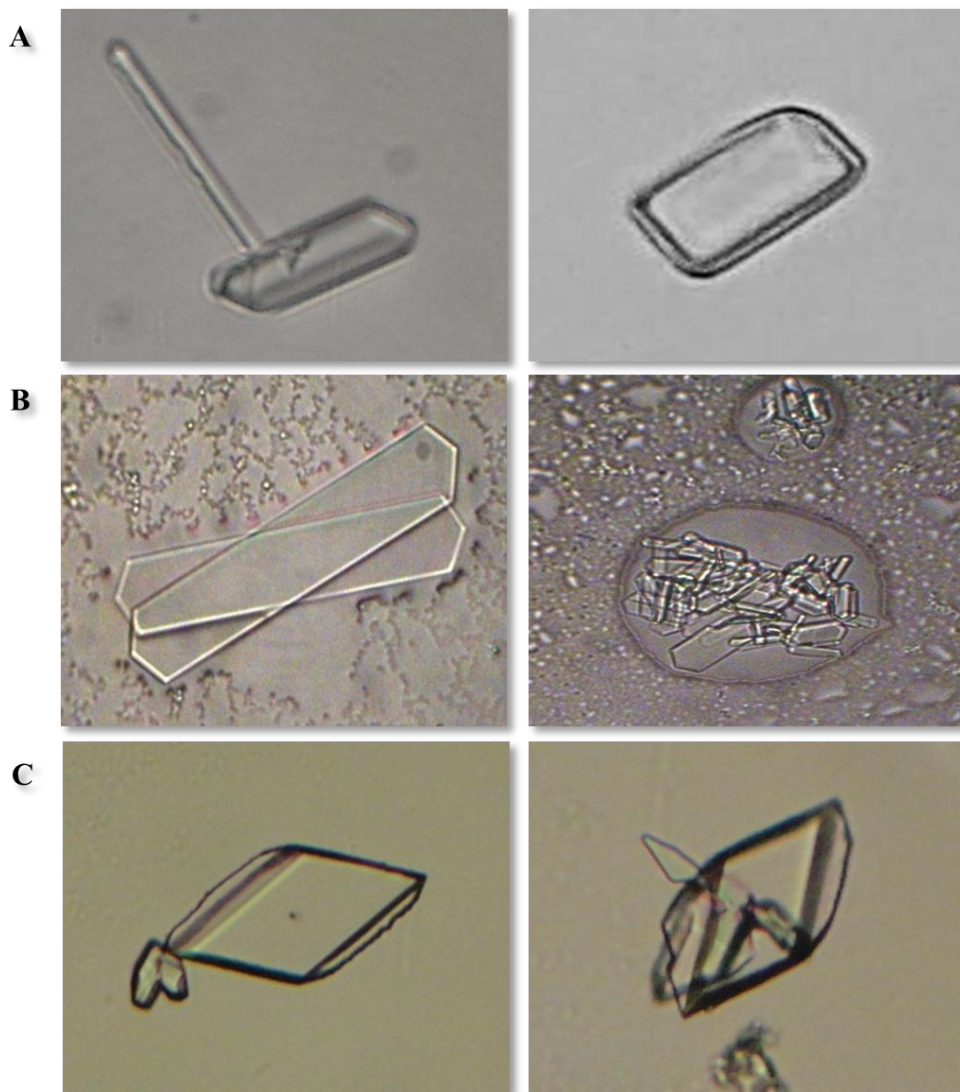


Figura 12. Mejores Condiciones de Cristalización. En estas condiciones observamos formación de monocristales con formas simétricas (Objetivo 40X). **A)** Ensayo (2), buffer 39 (0.1M HEPES Sodio pH: 7.5, 0.2 v/v PEG 400, 2.0M Sulfato de Amonio), Cristales en Agujas, Láminas y Cilindros. **B)** Ensayo (2), buffer 40 (0.1M Citrato de Sodio Tribásico di-hidratado pH: 5.6, 20% v/v 2-Propanol, 20% p/v PEG 4000), Cristales en Láminas. **C)** Ensayo (3), buffer 3 (0.4M Fosfato de Amonio Monobásico), Cristales en Rombos.

Una importante valoración de la calidad de los cristales, es someterlos a luz polarizada. Bajo la exposición de la luz polarizada, los cristales transforman la luz en colores,

mientras que el material que no forma cristales permanece oscuro. Conociendo en qué condiciones se obtuvieron formas cristalinas o cristales, se procedió a inspeccionar estas condiciones bajo luz polarizada. Pudiendo verificar que algunos de los cristales conseguidos tienen la propiedad de ser birrefringentes (**Figura 13**).

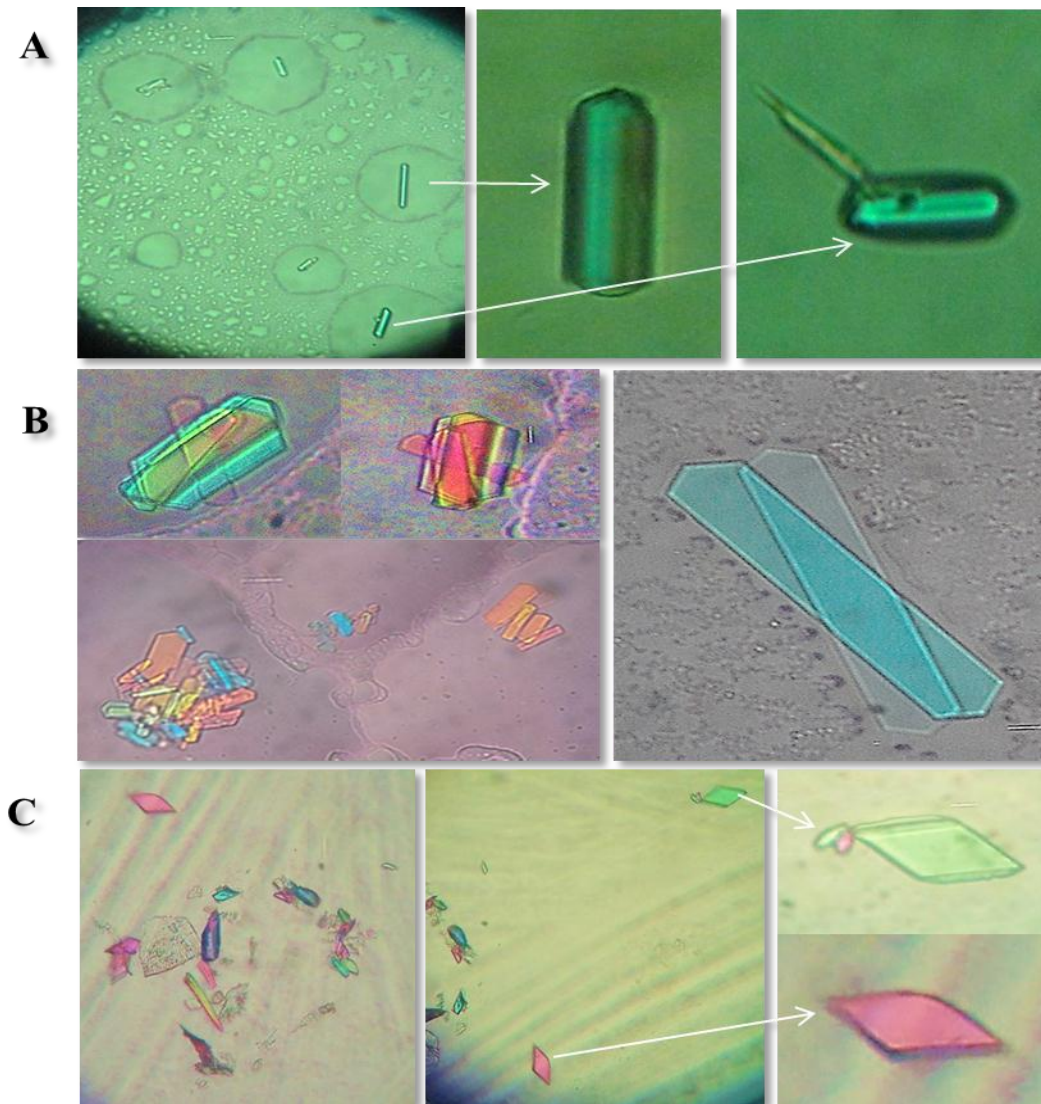


Figura 13. Cristales Birrefringentes bajo la Luz Polarizada. A) Ensayo (2), 1:1, buffer 39 (0.1M Hepes Sodio pH: 7.5, 0.2 v/v PEG 400, 2.0M Sulfato de Amonio), Cristales en cilindros. **B)** Ensayo (2), 1:1, buffer 40 (0.1M Citrato de Sodio Tribásico di-hidratado pH: 5.6, 20% v/v 2-Propanol, 20% p/v PEG 4000), Cristales en láminas. **C)** Ensayo (3), 2:1, buffer 3 (0.4M Fosfato de Amonio Monobásico), Cristales en Rombos (otras formas). Se puede observar el cambio de color de acuerdo al ángulo en que insidie la luz sobre el cristal.

La birrefringencia significa que hay dos velocidades distintas con la cual la luz puede propagarse, dependiendo de la dirección de propagación. Cuando un rayo de luz se divide en dos haces a medida que pasa a través de un material (cristal de proteína), el efecto se denomina birrefringencia (o doble refracción) y el material es birrefringente. Esta propiedad se comprobó al someter el cristal a un haz de luz polarizada, como resultado se cambió de color en los cristales de acuerdo al ángulo en que los impacto la luz (**Figura 13**). De acuerdo a nuestros resultados podemos decir que los cristales logrados tienen la propiedad de ser birrefringente. El paso a seguir es corroborar la capacidad de difracción de rayos X de estos cristales en un equipo de rayos-X para monocristales.

9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Uno de los mecanismo desarrollados por *Leishmania* para la evasión de la respuesta inmune en el mamífero, es la aparición de promastigotes apoptóticos en el inoculo que entra con la picadura del vector. Este proceso de apoptosis fundamental en el proceso infeccioso es debido a la función de la proteína EndoG (Van Zandbergen, et al., 2006), que desencadena la muerte celular programada (MCP) como un evento independiente de la vía de CASPASAS. La no exclusividad de la MCP por la vía de las CASPASAS había sido reportada en organismos eucariotas como *Caenorhabditis elegans* (Parrish, et al., 2001) y otros organismos (Irvine, et al., 2005, Kieper, et al., 2010, Oda, et al., 2007, Van Loo, et al., 2001). La búsquedas de genes que codifiquen proteínas involucradas en el proceso MCP en *Leishmania* dio como resultado una proteína homóloga en *Leishmania* a la Endonucleasa G, proteína reportada para otros organismos como causante de la MCP (Gannavaram, et al., 2008, Rico, et al., 2009), lo que indicaba que este proceso en *Leishmania* también podía ser mediado por EndoG. Por otro lado, no se han encontrado genes en *Leishmania* que codifiquen proteínas similares a las CASPASAS. La publicación de datos demostrando hay MCP en *Leishmania*, evidenció que EndoG de *Leishmania* es una enzima clave para que *Leishmania* entre en un proceso de MCP (Rico, et al., 2009).

Aunque la producción heteróloga de EndoG de *Leishmania* en *E. coli* ya había sido reportada (Toro, et al., 2011), la cantidad y concentraciones obtenidas no superaban los nanogramos (100ng/ml). En este trabajo se utilizó el mismo vector pET28, y la EndoG clonada tiene un tamaño de 43.4kDa en vez de 39.49kDa, esto por la presencia de algunos aminoácidos que son codificados por el vector, como las dos colas His-tag. Los resultados de actividad de la proteína EndoG (Toro, et al., 2011), como los nuestros, muestran que estos 42 aminoácidos no alteran la función endonucleasa de la enzima. Nuestros datos muestran una producción de hasta 15mg de proteína activa y con una pureza de más del 90% como se puede observar en la **Figura 8**. Además, se pudo obtener concentraciones de EndoG hasta 3.3mg/ml, con la utilización de detergentes como Tritón X-100 a una concentración de 0.05 % (v/v); y el aumento de las interacciones electrostáticas (Salting in) por la adición de 100 mM de NaCl y 0.4mM

de KCl. La inhibición de la actividad endonucleasa fue inhibida con KCl como lo indicaron publicaciones previas (Toro, et al., 2011).

El encontrar las condiciones de renaturalización, lograr concentraciones de 3.3mg/ml y seguir teniendo una proteína activa son logros importantes de este trabajo. Aunque la estructura tridimensional de la proteína EndoG es el objetivo final, no es del alcance de este trabajo de grado. Sin embargo, un paso previo a la determinación de la estructura tridimensional de proteínas es su cristalización cuando la proteína excede los 30kDa, como es el caso de la EndoG. Ya que la cristalización requiere de cantidades grandes de proteína en el orden de miligramos; proteínas con una pureza alta (> 90%); y proteínas las cuales se les pueda comprobar que están activas. Procedimos a realizar los primeros ensayos de cristalización de proteínas con la enzima EndoG de un parásito que es endémico en algunas regiones de Colombia. Este trabajo reporta los primeros cristales de proteína EndoG de *L. (V) panamensis*. La cristalización de la EndoG mostró la formación de cristales en forma de aguja a una relación de 0.5µl proteína/1.0µl buffer, estos cristales no son muy adecuados para un posterior análisis de difracción de rayos-X. Sin embargo, el principal objetivo del trabajo se cumplió al obtener monocristales de EndoG (**Figura 12 y 13**), este resultado es altamente novedoso y de suma importancia para trabajos futuros. Este trabajo abordó un método científico de vanguardia el cual es considerado el factor limitante para la dilucidación de las estructuras tridimensionales de proteínas.

10. PERSPECTIVAS

En este trabajo se lograron obtener las primeras condiciones de cristalización para la proteína EndoG. A futuro se espera hacer una optimización de las condiciones de cristalización y poder realizar la obtención de los datos de difracción que posibiliten hacer el análisis de rayos X, que posiblemente permitan esclarecer la estructura de EndoG de *L. (V) panamensis* para ser publicados en el PDB para que tanto científicos de Colombia como a nivel mundial se beneficien de estos hallazgos.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Ashkan, M. M., and K. M. Rahim. 'Visceral Leishmaniasis in Paediatrics: A Study of 367 Cases in Southwest Iran', *Trop Doct* **Vol. 38, No. 3**, 186-8, 2008.
- Ashkenazi, A. 'Targeting Death and Decoy Receptors of the Tumour-Necrosis Factor Superfamily', *Nat Rev Cancer* **Vol. 2, No. 6**, 420-30, 2002.
- Bari, A. U. 'Clinical Spectrum of Nasal Leishmaniasis in Muzaffarabad', *J Coll Physicians Surg Pak* **Vol. 19, No. 3**, 146-9, 2009.
- Desjeux, P. 'Leishmaniasis: Current Situation and New Perspectives', *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **Vol. 27, No. 5**, 305-18, 2004.
- Gannavaram, S., C. Vedvyas, and A. Debrabant. 'Conservation of the Pro-Apoptotic Nuclease Activity of Endonuclease G in Unicellular Trypanosomatid Parasites', *J Cell Sci* **Vol. 121, No. Pt 1**, 99-109, 2008.
- Gossage, S. M., M. E. Rogers, and P. A. Bates. 'Two Separate Growth Phases During the Development of Leishmania in Sand Flies: Implications for Understanding the Life Cycle.', *Int J Parasitol* **Vol. 33, No. 10**, 1027-34, 2003.
- Irvine, R. A., N. Adachi, D. K. Shibata, G. D. Cassell, K. Yu, Z. E. Karanjawala, C. L. Hsieh, and M. R. Lieber. 'Generation and Characterization of Endonuclease G Null Mice.', *Mol Cell Biol* **Vol. 25, No. 1**, 294-302, 2005.
- Ishihara, Y., and N. Shimamoto. 'Involvement of Endonuclease G in Nucleosomal Dna Fragmentation under Sustained Endogenous Oxidative Stress', *J Biol Chem* **Vol. 281, No. 10**, 6726-33, 2006.
- Jancarik, J and Kim, S. H. . 'Sparse Matrix Sampling: A Screening Method for Crystallization of Proteins', *J. Appl. Cryst* **Vol. 24, 2**, 1991.
- Kieper, J., C. Lauber, O. Gimadutdinow, A. Urbańska, I. Cymerman, M. Ghosh, B. Szczesny, and G. Meiss. 'Production and Characterization of Recombinant Protein Preparations of Endonuclease G-Homologs from Yeast, C. Elegans and Humans.', *Protein Expr Purif* **Vol. 73, No. 1**, 99-106, 2010.
- Kitchen, D. B., H. Decornez, J. R. Furr, and J. Bajorath. 'Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications.', *Nat Rev Drug Discov* **Vol. 3, No. 11**, 935-49, 2004.
- Lee, N., S. Bertholet, A. Debrabant, J. Muller, R. Duncan, and H. L. Nakhasi. 'Programmed Cell Death in the Unicellular Protozoan Parasite Leishmania.', *Cell Death Differ* **Vol. 9, No. 1**, 53-64, 2002.
- Leist, M., and M. Jaattela. 'Four Deaths and a Funeral: From Caspases to Alternative Mechanisms', *Nat Rev Mol Cell Biol* **Vol. 2, No. 8**, 589-98, 2001.
- Lewis, D. J. 'Phlebotomid Sandflies.', *Bull World Health Organ* **Vol. 44, No. 4**, 535-51, 1971.
- Loll, B., M. Gebhardt, E. Wahle, and A. Meinhart. 'Crystal Structure of the Endog/Endogi Complex: Mechanism of Endog Inhibition.', *Nucleic Acids Res* **Vol. 37, No. 21**, 7312-20, 2009.
- Marín, M., Y. A. Aguilar, J. R. Ramírez, O. Triana, and C. E. Muskus. '[Molecular and Immunological Analyses Suggest the Absence of Hydrophilic Surface Proteins in Leishmania (Viannia) Panamensis].', *Biomedica* **Vol. 28, No. 3**, 423-32, 2008.
- Michael M, Roberts., Heng. Jerry YY, and Williams Daryl R. 'Protein Crystallization by Forced Flow through Glass Capillaries: Enhanced Lysozyme Crystal Growth', *Crystal Growth & Design* **Vol. 10, No. Protein Crystallization**, 10, 2009.
- Moreno, C., and J. Sanchez. 'Estructura De Proteínas', *Ariel Ciencia* **Vol. 1, No. 156**, 567, 2003.

- Oda, K., N. Kawasaki, M. Fukuyama, and S. Ikeda. 'Ectopic Expression of Mitochondria Endonuclease Pnu1p from *Schizosaccharomyces Pombe* Induces Cell Death of the Yeast.', *J Biochem Mol Biol* **Vol. 40, No. 6**, 1095-9, 2007.
- Oshaghi, M. A., N. M. Ravasan, E. A. Javadian, M. Mohebbali, H. Hajjaran, Z. Zare, F. Mohtarami, and Y. Rassi. 'Vector Incrimination of Sand Flies in the Most Important Visceral Leishmaniasis Focus in Iran', *Am J Trop Med Hyg* **Vol. 81, No. 4**, 572-7, 2009.
- Parrish, J., L. Li, K. Klotz, D. Ledwich, X. Wang, and D. Xue. 'Mitochondrial Endonuclease G Is Important for Apoptosis in *C. Elegans*', *Nature* **Vol. 412, No. 6842**, 90-4, 2001.
- Pellettieri, J., and A. Sanchez Alvarado. 'Cell Turnover and Adult Tissue Homeostasis: From Humans to Planarians', *Annu Rev Genet* **Vol. 41**, 83-105, 2007.
- Penkova, A., W. Pan, F. Hodjaoglu, and P. G. Vekilov. 'Nucleation of Protein Crystals under the Influence of Solution Shear Flow', *Ann N Y Acad Sci* **Vol. 1077**, 214-31, 2006.
- Peters, N. C., and D. L. Sacks. 'The Impact of Vector-Mediated Neutrophil Recruitment on Cutaneous Leishmaniasis', *Cell Microbiol* **Vol. 11, No. 9**, 1290-6, 2009.
- Rathmell, J. C., and C. B. Thompson. 'Pathways of Apoptosis in Lymphocyte Development, Homeostasis, and Disease', *Cell* **Vol. 109 Suppl**, S97-107, 2002.
- Rico, E., J. F. Alzate, A. A. Arias, D. Moreno, J. Clos, F. Gago, I. Moreno, M. Dominguez, and A. Jimenez-Ruiz. 'Leishmania Infantum Expresses a Mitochondrial Nuclease Homologous to Endog That Migrates to the Nucleus in Response to an Apoptotic Stimulus', *Mol Biochem Parasitol* **Vol. 163, No. 1**, 28-38, 2009.
- Romero, M., and J. Sánchez. 'Una Mirada a La Epidemiología Y Control De Las Leishmaniasis Zoonóticas En Colombia', *Biosalud* **Vol. 6, No. 1**, 99-111, 2007.
- Sacks, D. L. 'Metacyclogenesis in *Leishmania* Promastigotes.', *Exp Parasitol* **Vol. 69, No. 1**, 100-3, 1989.
- Sygyusch, J., R. Coulombe, J. M. Cassanto, M. G. Sportiello, and P. Todd. 'Protein Crystallization in Low Gravity by Step Gradient Diffusion Method', *J Cryst Growth* **Vol. 162, No. 3-4**, 167-72, 1996.
- Sánchez, L., and E. Sáenz. 'Leishmaniasis', *Dermatología Peruana* **Vol. 14, No. 2**, 83-98, 2004.
- Toro, L., Edwin. Patiño, Sara. Robledo, Ruiz Antonio. Jiménez, and Juan Fernando Alzate. 'Leishmania (Viannia) Panamensis Expresses a Nuclease with Molecular Andbiochemical Features Similar to the Endonuclease G of Higher Eukaryotes', *Colombia Médica* **Vol. 41, No. 2**, 154-65, 2011.
- Van Loo, G., P. Schotte, M. van Gorp, H. Demol, B. Hoorelbeke, K. Gevaert, I. Rodriguez, A. Ruiz-Carrillo, J. Vandekerckhove, W. Declercq, R. Beyaert, and P. Vandenabeele. 'Endonuclease G: A Mitochondrial Protein Released in Apoptosis and Involved in Caspase-Independent Dna Degradation', *Cell Death Differ* **Vol. 8, No. 12**, 1136-42, 2001.
- Van Zandbergen, G., A. Bollinger, A. Wenzel, S. Kamhawi, R. Voll, M. Klinger, A. Müller, C. Hölscher, M. Herrmann, D. Sacks, W. Solbach, and T. Laskay. 'Leishmania Disease Development Depends on the Presence of Apoptotic Promastigotes in the Virulent Inoculum.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **Vol. 103, No. 37**, 13837-42, 2006.
- Wang, X. 'The Expanding Role of Mitochondria in Apoptosis.', *Genes Dev* **Vol. 15, No. 22**, 2922-33, 2001.
- Zangger, H., J. C. Mottram, and N. Fasel. 'Cell Death in *Leishmania* Induced by Stress and Differentiation: Programmed Cell Death or Necrosis?', *Cell Death Differ* **Vol. 9, No. 10**, 1126-39, 2002.
- Zuzarte-Luis, V., and J. M. Hurlle. 'Programmed Cell Death in the Developing Limb', *Int J Dev Biol* **Vol. 46, No. 7**, 871-6, 2002.