



# De la mitocondria a los parásitos: un viaje con muchos intervalos

José Luis Ramírez Ochoa <sup>1</sup>.

<sup>1</sup>PhD Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) e Instituto de Biología Experimental de la UCV, Caracas, Venezuela

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 07 de Junio del 2023 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

## RESUMEN

LXXII CONVENCIÓN ANUAL DE AsoVAC "Ciencia y Arte: dos caminos para el progreso." Facultad de Ciencias de la UCVEn el presente ensayo fue presentado en el ciclo de Conferencias "Fronteras de la Ciencia" de la Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia (2022), en ocasión del homenaje rendido a los premiados con el Premio Fundación Empresas Polar "Lorenzo Mendoza Fleury". En el mismo hago un recorrido de mi carrera dedicada a la actividad científica en un ambiente Latinoamericano. Al mismo tiempo, hago una reflexión de como políticas científicas acertadas durante la democracia en Venezuela nos permitió a una cohorte de jóvenes investigadores tener acceso a la educación en instituciones elite del mundo y regresar para dar lo de mejor de nosotros a la educación y desarrollo del país.

**PALABRAS CLAVE:** Ensayo, Ciencia en Latinoamérica, Biología Molecular, Educación

## SUMMARY

This essay was presented in the cycle of Conferences "Frontiers of Science" of the Venezuelan Association for the Advancement of Science (2022), on the occasion of the tribute paid to the winners of the Fundación Empresas Polar "Lorenzo Mendoza Fleury" Award. In it I take a tour

of my career dedicated to scientific activity in a Latin American environment. At the same time, I reflect on how successful scientific policies during democracy in Venezuela allowed a cohort of young researchers to have access to education in elite institutions in the world and return to give our best to education and development of the country

**KEY WORDS:** Essay, Science in Latin America, Molecular Biology, Education

## ENSAYO

La carrera científica como la de los artesanos, comienza con el conocimiento básico y el amor por la ciencia transmitido por maestros. La Escuela de Biología de la Universidad Central de Venezuela de mi época era un hervidero de revolución científica y política. Justo al año de mi entrada comenzó la revolución académica, a través de la cual se hizo un dramático cambio curricular, pasando de una biología netamente descriptiva a otra experimental. Coincidiendo con este cambio tuvimos la inmensa suerte de recibir una ola de profesores emigrados de países del sur del continente americano dominados por dictadores militares. Es así, como entre a conocer las nuevas tendencias de la ciencia, y a reconocer la importancia de la cooperación internacional. La ciencia se realiza no solo en los laboratorios, si no perteneciendo a una comunidad internacional de pares.

Dentro del grupo de Profesores Argentinos me llamó la atención el Dr. Néstor González-Cadavid, infatigable luchador, cuidadoso investigador quien me enseñó a emplear correctamente el método científico y a conectarme con el mundo internacional de la ciencia. El tema escogido para mi tesis de licenciatura consistía en estudiar la regeneración hepática en ratas parcialmente hepatectomisadas en presencia del antibiótico cloranfenicol, el cual actuaba sobre la mitocondria. Así, comienzo un viaje hacia el estudio de ADN, en este caso el mitocondrial. Terminada mi tesis, la misma fue publicada en el *International Biochemical Journal*<sup>(1)</sup>. Es notable que durante esos años estos inmigrantes enfatizaron la necesidad de publicar en buenas revistas la investigación que se hacía a nivel de licenciatura. Al terminar mi tesis, Néstor inmediatamente comenzó a contactar potenciales tutores para hacer mi doctorado en universidades de renombre de los Estados Unidos de América. En esta búsqueda, el Profesor Henry Malher de la Universidad de Notre Dame (Indiana) le recomendó al Dr. Igor Dawid quien trabajaba en el Departamento de Embriología del *Carnegie Institution of Washington*, y quien era además Profesor de la Johns Hopkins University en Baltimore, Maryland. De nuevo, hago notar que estos Profesores venidos del Sur ayudaron a catapultar una ola de egresados de la Facultad de Ciencias para que terminaran su formación de Postgrado en universidades de excelencia en las áreas de la Física, Matemáticas, Química y Biología.

Llegando a Baltimore, además de tomar las asignaturas de Postgrado, las cuales en su mayoría trataban sobre la fisicoquímica de macromoléculas, comencé de inmediato a trabajar en lo que sería mi tesis doctoral, la cual consistía en estudiar cómo se replicaba el ADN mitocondrial en el sapo surafricano *Xenopus laevis*. A medio camino de la ejecución de mi investigación llegó al *Carnegie Institution* una solicitud de la Universidad de Stanford al laboratorio de Don Brown investigador del Instituto, pidiendo una muestra de ADN ribosomal de *Xenopus laevis* a fin hacer experimentos de recombinación con un plásmido

bacteriano. Este intercambio resultó en la replicación de un ADN de origen animal dentro de la bacteria *Escherichia coli*. La historia de la publicación de estos experimentos es bien conocida <sup>(2)</sup>, y generó la famosa conferencia ASILOMAR destinada a reglamentar el uso de ADN recombinante. El intercambio con Stanford determinó a su vez que uno de los Postdoctorales del laboratorio de Stanley N. Cohen, John Munroe, viniera a nuestra institución a enseñarnos como usar la nueva tecnología. En Hopkins además estaban los descubridores de las enzimas de restricción y ganadores del Premio Nobel, Hamilton Smith y Daniels Nathan, quienes nos donaron las cepas bacterianas que producían estas enzimas, las cuales usé para las siguientes fases de mi tesis. Eran momentos electrizantes donde se vislumbraba el inmenso potencial de la nueva biología molecular y el nacimiento de la biotecnología moderna. De las cosas más importantes que aprendí durante mi tesis dirigida por Igor, están: rigurosidad y reproducibilidad de la experimentación, la humildad ante nuestros hallazgos, el darle crédito primario de las investigaciones a nuestros colaboradores más jóvenes. También publicamos dos trabajos en el *Journal of Molecular Biology* en donde reportamos por primera vez que el ADN mitocondrial se replica de manera bidireccional pero asimétricamente, y se hizo por primera vez un estudio comparativo de variaciones en patrones de restricción entre dos especies de *Xenopus* <sup>(4)</sup>. En la actualidad, este tipo de estudio sirve de base para el análisis del matrilineaje en estudios poblacionales o forenses. <sup>(3)</sup>, en el segundo trabajo logramos mapear los RNA de transferencia mitocondriales,

En junio del año 1977, una vez terminada mi tesis doctoral y con grandes deseos de volver a mi país, me encontré con un choque cultural y científico, estaba el país disfrutando de una bonanza petrolera a raíz del embargo petrolero de los países árabes lo cual impactó los costos de vida, y hacia muy difícil la vida para un profesor de categoría de instructor. Además, pocos de mis colegas lograron recibir en su educación de postgrado conocimientos sobre la disruptiva y nueva disciplina de la biología molecular. Me propuse en ese momento, enseñar y divulgar el potencial de la Biología Molecular, pero me vi imposibilitado de desarrollar mi pasión por la biología del desarrollo debido a las precarias condiciones del Instituto de Biología Experimental de la UCV. Así que, con una reciente comunidad de bioquímicos estudiando enfermedades parasitarias, comencé a hurgar en el genoma del parásito *Leishmania*, el cual se cultivaba de manera fácil, y además me brindaba la posibilidad de tener colegas con los cuales aprender y discutir.

Con mucho esfuerzo, y no menos resistencias, comencé a crear un laboratorio de biología molecular junto con el apreciado colega Oscar Valbuena. Durante 25 años luchamos por desarrollar la tecnología recombinante, en una época donde no existían kits comerciales, preparábamos todos los insumos biológicos con los cuales trabajábamos, no teníamos técnicos ni asistentes secretariales. Todo esto no impidió que publicáramos activamente cubriendo diversos entes biológicos: los virus de papiloma <sup>(5,6,7)</sup> y de la hepatitis B <sup>(8)</sup>, *Plasmodium* <sup>(9)</sup>, *Leishmania* <sup>(10,11,12,13)</sup> *Trypanosoma cruzi* <sup>(14,15)</sup>, lupus eritematoso sistémico <sup>(16)</sup>, *Helicobacter* <sup>(17,18)</sup> y procesos cerveceros <sup>(19)</sup>. Además, logramos adoptar rápidamente la técnica de PCR en su forma original la cual era muy engorrosa, y llevarla a estudios de campo junto con ilustres investigadores como los profesores José Vicente Scorza, Néstor Añez, Hugo Carrasco, y Belkys Noya.

La diversidad de modelos biológicos estudiados respondía la necesidad de varios grupos del país de utilizar las herramientas de la biología molecular, y la facilidad con la cual la biología molecular puede ajustarse a cualquier fuente de ADN. De nuestros aportes al conocimiento de las infecciones por *Leishmania* y *Trypanosoma cruzi*, están: la persistencia parasitaria aún después de la cura clínica (20,21), la presencia de *Trypanosoma cruzi* en biopsias cardíacas de enfermos crónicos lo cual no apoyaba la idea de la autoinmunidad como causa fundamental de la miocarditis chagásica (22).

Durante mi paso por la UCV y con la ayuda de la cohorte de profesores que habían regresado con sus doctorados, en el año 1986 pude crear el Postgrado en Biología Celular de la Facultad de Ciencias.

En el año 1994, terminé un primer ciclo de mi vida asociada con la UCV, y decidí tomar un año sabático que se extendió a casi tres en el instituto Seattle Biomedical Research Institute (SBRI) donde generosamente me recibió el Dr. Ken Stuart. A través del SBRI me asociaron al Departamento de Patobiología de la Universidad del Estado de Washington. De nuevo, no sé si por mera suerte, o por buen olfato me tocó vivir un momento importante de la biología molecular, como lo es el nacimiento de la genómica. Aunque aprovechaba la oportunidad para continuar la investigación que venía adelantando en Caracas y dirigiendo a mis estudiantes a través de la internet, poco a poco me fui integrando a la resolución del genoma de *Leishmania* y *Trypanosoma cruzi*.

Al año de estar en Seattle, me enteré que un viejo conocido, el Profesor Maynard Olson, de quien aprendí la técnica de electroforesis de campo pulsado (CHEF), se había mudado desde San Louis Missouri a Seattle y participaba en la Iniciativa de secuenciar el genoma humano dirigida por Francis Collins. Maynard estaba tratando de clonar los telómeros humanos a través de una tecnología que parecía ingenua, y para probar la tecnología había logrado atrapar los extremos de *Leishmania donovani* y *Trypanosoma brucei*, no pudiendo tener éxito con los telómeros humanos. Maynard me donó la tecnología y estudiamos y publicamos algunos de sus clones de *Leishmania* (23). La tecnología la transmití rápidamente vía internet a mi estudiante de doctorado Miguel Angel Chiurillo, pero decidimos desarrollarla de una forma que nos permitiera atrapar segmentos grandes de telómero y subtelómero de *Trypanosoma cruzi* utilizando cromosomas artificiales de bacteria (24,25). La razón para el cambio de modelo biológico y tecnología se debía en primer lugar a que el subtelómero de *Leishmania* era muy complicado, y segundo, los recombinantes pequeños no nos daban mucha información. En cambio, en *T. cruzi* obtuvimos recombinantes por encima de los treinta mil pares de bases lo cual nos permitió obtener información importante sobre la dinámica de variabilidad de este parásito (26). Es así como entramos en la publicación del genoma de *Trypanosoma cruzi* publicado en el año 2005 la prestigiosa revista *Science* (27).

De vuelta a Venezuela doy inicio a dos actividades importantes, la primera impulsar el Centro de Biotecnología del Instituto de Estudios Avanzados, creado por el Dr. Rafael Rangel, y poco después hacerme cargo del Programa de la Universidad de las Naciones Unidas “Biotecnología para Latinoamérica y el Caribe”, durante el ejercicio de esta función y con la valiosa colaboración de colegas de Latinoamérica y de otras latitudes, promoví el desarrollo

de la biotecnología y la biología molecular de la región (28), incluyendo la creación de laboratorio de genética forense modernos en Latinoamérica y el Caribe, los estudios para mejorar las bioseguridad en el uso de organismos transgénicos (29), y la creación de un consorcio para descifrar el genoma de la cepa de uvas Tanart de Uruguay. También, iniciamos en el IDEA la aplicación de la biotecnología en la preservación de obras de arte y del patrimonio público (30).

En el IDEA, no solo he continuado los estudios en genómica de *Trypanosomatidos*, sino que a su vez implementamos un servicio de genética forense acorde con los estándares internacionales. A través de un proyecto grupal del CONICIT, adquirimos dos secuenciadores mono capilares, uno para la Universidad del Zulia y el otro para nuestro Centro. Seguidamente, comenzamos un período de entrenamiento con la ayuda del Grupo Español-Portugués de Genética Forense, hasta alcanzar el conocimiento adecuado y la certificación de nuestros procedimientos y creamos las primeras bases de datos para uso forense de la población venezolana (31, 32).

Durante todos estos años nos dedicamos a estudiar los telómeros y la telomerasa de *Trypanosoma cruzi* (33) y *Leishmania major* (34,35), habiendo encontrado una basta cantidad de información relacionada la dinámica de variabilidad del genoma de *T. cruzi*. Actualmente nos encontramos realizando experimentos de edición génica utilizando la tecnología CRISPR con el fin de inactivar el gen de la telomerasa de *T. cruzi*. Con esta experiencia queremos saber si el parásito puede sobrevivir a través de mecanismos alternativos a la ausencia de telomerasa. De no poderse escapar, tendríamos a nuestra disposición un arsenal de compuestos antitelomerasa que han sido empleados para el tratamiento del cáncer en humanos, a los cuales el parásito es 10 veces más susceptible.

Finalmente, como dándole vuelta y cerrando ciclos vitales, algunas de nuestras últimas publicaciones tienen que ver con la mitocondria, se trata de un estudio poblacional sobre la mutación que causa el síndrome MELAS (36, 37), enfermedad con poca incidencia en la población venezolana, pero que causa terribles estragos en los pacientes que la padecen.

De esta larga experiencia, quiero destacar que más que intelecto es perseverancia y sudor, evitando asociaciones negativas o pesimistas, sin tener complejos frente a laboratorios más poderosos del exterior. Estar en el lugar adecuado y aprovecharlo al máximo, aceptar con humildad y firmeza toda cooperación internacional, pues la investigación en la biología moderna es multidisciplinaria y corporativa. Y lo mejor de todo, es un viaje vocacional en su propio país siéndole útil en todo lo que me fue posible.

## REFERENCIAS

1. González-Cadavid, N.F., Avila-Bello, E. y Ramírez, J.L. "Differential long term effects of D-chloramphenicol in the biogenesis of mitochondria, in normal and regenerating rat liver. Biochem. J. (1970) 118:577-586.

2. Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W., & Helling, R. B. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1973) 70(11), 3240-3244.
3. Ramírez, J.L. y Dawid, I.B. Mapping of mitochondrial DNA in *Xenopus laevis* and *Xenopus borealis*. *J. Mol. Biol.* (1978). 119:133-146.
4. Ohi, S., Ramírez, J.L. y Dawid, I.B. Mapping of Mitochondria 4S RNA genes by electron microscopy. *J. Mol. Biol.* (1978) 121: 299-310.
5. Premoli de Percoco, G., Galindo, I., y Ramírez, J.L. In situ hybridization with digoxigeninlabelled DNA probes for the detection of human papillomavirus-induced focal epithelial hyperplasia among Venezuelans *Virchows Archiv-A Pathol. Anat.* (1992) 420:295-300.
6. Premoli de Percoco, G., Galindo, I., Ramírez, J.L., Perrone, M. y Rivera, H. Detection of human papillomavirus-related oral verruca vulgaris among venezuelans. *J. Oral Pathol. Med.* (1993) 22:113-116.
7. Premoli de Percoco, Pinto-Cisternas, J., Ramírez, J.L. y Galindo, I. Focal Epithelial Hyperplasia: HPV virus-induced disease with a genetic predisposition in a Venezuelan family. *Hum. Genet.* (1993) 91:386-388.
8. Toro, F.I., Ramírez, J.L., Bianco, N. y Machado, I.V. Técnicas de Biología Molecular para la detección del Virus de Hepatitis Delta I: Obtención de la sonda diagnóstica específica. *GEN* (1989).43:177-181.
9. Urdaneta, L., Guevara, P. and Ramírez, J.L. Evaluation of DNA Recombinant Methodologies for the Diagnosis of *Plasmodium. falciparum* and their Comparison with the Microscopy Assay. *Mem. Inst. Oswaldo cruz* (1998) 93:639-646.
10. Ramírez, J.L. y Guevara, P. The ribosomal gene spacer as a tool in the taxonomy of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* (1987) 22:177-183.
11. Guevara, P., Alonso, G., Da Silveira, J.F., De Mello, M., Scorza, J.V., Añez, N. y Ramírez, J.L. Identification of New World *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes. *Mol. Biochem. Parasitol.* (1992) 56:15-26.
12. Guevara, P., Rojas, E., González, N., Scorza, J.V., Añez, N., Valera, M. and Ramírez, J.L. Presence of *Leishmania braziliensis* in blood samples from cured patients or at different stages of immunotherapy. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* (1994) 1:385-389.
13. Delgado, O., Guevara, P., Silva, S., Belfort, E y Ramírez, J.L. Follow-up of a human accidental infection by *Leishmania (V) braziliensis*, using conventional immunological techniques and PCR. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (1996) 55:267-272
14. Ramírez, J. L., Galindo, I., Guevara, P., Da Silveira, J. F., Novak, E., González, N., Añez, N. y Scorza, J. V. Detection and identification of Chagas' disease agent *Trypanosoma cruzi*, using nonradioactive genetic probes. *Annals of XVII World Congress of Anatomical and Clinical Pathology* Ed. G.G Santoscoy , Monduzzi Editore (1993). pp 13-16.
15. González, N., Galindo, I., Guevara, P., Novak, E., Scorza, J.V., Añez, N., da Silveira, J.F. and Ramírez, J.L. Identification and detection of *Trypanosoma cruzi* by using a DNA amplification fingerprint obtained from the ribosomal intergenic spacer. *J. Clin. Microbiol.* (1994) 2:153-158.
16. Blassini, A.M., Delgado, M.B., Valdivieso, C., Guevara, P., Ramírez, J.L., Stekman, I.L., Williams, R.C. y Rodríguez, M.A. Restriction fragment length polymorphisms of constant region genes of immunoglobulin lambda chains in Venezuelan patients with systemic

- lupus erythematosus. *Lupus* (1996) 55:267-272.
- 17. Chiurillo, M. A., Moran, Y., Cañas, M., Valderrama E., Granda N., Sayegh, M., Ramírez J. L. Ramírez J. L. Genotyping of *Helicobacter pylori* virulence associated genes shows high diversity of strains infecting patients in Western Venezuela. *International J. of Infec. Dis.* (2013) 17(9): e750-6.
  - 18. Torres, Keila; Valderrama, E., Sayegh, M., Ramirez, J. L., y Chiurillo, M A. Study of the oipA genetic diversity and EPIYA motif patterns in cagA-positive *Helicobacter pylori* strains from Venezuelan patients with chronic gastritis. *Microbial Pathogenesis*. (2014) 76:26-32.
  - 19. Galindo, I., Rangel-Aldao, R. y Ramírez, J.L. A combined PCR-colour development reaction hybridisation assay in a microtiter format for the detection of *Clostridium* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1993) 39:553-557.
  - 20. Guevara, P., Ramírez, J.L., Elina Rojas, Jose V. Scorza, Nestor González y Nestor Añez PCR detection of *Leishmania braziliensis* in blood samples 30 years after spontaneous cure. *Lancet* (1993) 341:1341.
  - 21. Ramírez, J.L. y Guevara, P. () Persistent infection by *Leishmania* (V) *braziliensis* *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* (1997) 92:333-338.
  - 22. Añez, N., Carrasco H., Parada, H., Crisante, G., Rojas, A., Fuenmayor, C., Gonzalez, N., Percoco, G., Borges, R., Guevara, P. and Ramirez, J.L. Myocardial parasite persistence in chronic chagasi patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (1999) 60:726-732.
  - 23. Chiurillo, M.A, Beck, A.E., Devos, T., Myler, P.J., Stuart, K. y Ramirez, J.L. Cloning and Characterization of *Leishmania donovani* telomeres. *Exp. Parasitol.* (2000) 94:248-258.
  - 24. Chiurillo, M.A., Santos, M.R. M., Franco Da Silveira, J. y Ramírez, J.L. An improved general approach for cloning and characterizing telomeres: the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* as model organism. *Gene* (2002) 294:197-204.
  - 25. Kim, D., Chiurillo, M. A., El-Sayed, N. Jones, K., Santos, M.R.M., Cerda,P.P. Andersson, B., Myler, P., Franco da Silveira, J. y Ramírez, J.L. Telomere and subtelomere of *Trypanosoma cruzi* chromosomes are enriched in (pseudo)genes of retrotransposon hot spot and transialidase-like gene families: the origins of *T. cruzi* telomeres. *Gene* (2005) 346:153-161.
  - 26. Moraes Barros, R.R., Marini,M.M., Antônio,C.R., Cortez,C.R., Miyake, A.M., Lima, F.M., Ruiz, J.C., Bartholomeu, D.C., Chiurillo, M. A, Ramirez, J.L. y Franco da Silveira, J. Anatomy and evolution of telomeric and Subtelomeric regions in the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *BMC0 Genomics* (2012) 13:229.
  - 27. El -Sayed, Najib et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiological agent of Chagas' disease. *Science* (2005) 309:410-415.
  - 28. Ramirez, J.L. y Holmes, D. The need for genomics networking in Latin America, *SciDev.Net* <http://www.scidev.net/> Agosto 14 (2003).
  - 29. Ramírez, J.L. Biosafety why and for whom?, Latin America on target. *Interciencia* (2003) 669-672.
  - 30. Ramírez, J.L., Santana, M.A y Galindo-Castro, I. The role of Biotechnology in art preservation. *Trends in Biotech.* (2005) 23:584-588
  - 31. Pineda Bernal, L, Borjas, L., Zabala, W, Tovar, F., Portillo, M.G., Lander N., Fernández, E., Chiurillo, M.A., Ramírez, J.L. Genetic variation of 15 STR autosomal loci in the Maracaibo population from Venezuela. *Forens. Sci. Int.* (2006) 161:60-63.
  - 32. Lander, N., Rojas, M.G., Chiurillo, M.A., y Ramírez, J.L. Haplotype diversity in Human

- mitochondrial DNA hypervariable regions I, II and III in the city of Caracas (Venezuela). *Forens. Sci. Int. Genetics* (2008). 2 e61-e64.
33. Campelo, R., Galindo, M.M., Ramirez, J.L. Charaterization of *Trypanosoma cruzi* Telomerase. *Acta Tropica* (2011) 120:171-178.
34. Galindo M.M., A, Rodriguez, E., Rojas, M.G., Figarella, K., Campelo, R., y Ramírez, J.L. Heat-activated and Thermo-resistant Telomerase Activity in *Leishmania major* Friedlin. *Acta Tropica* (2009) 111:86-89.
35. Riward Campelo, Isabel Díaz Lozano, Katherine Figarella, Antonio Osuna and José Luis Ramírez, *Leishmania major* telomerase TERT protein has a nuclear mitochondriaeclipsed distribution that is affected by oxidative stress. (2015) *Infect. Immunity* 83:57-66.
36. Florez I, Pirrone I, Casique L, et al. Independent origin for m.3243A>G mitochondrial mutation in three Venezuelan cases of MELAS syndrome *Clin Biochem.* (2022) S00099120(22)00221-1.
37. Casique L, De Lucca M, Mahfoud A, Luis Ramírez J. (2022) MELAS a clinically and genetically heterogeneous syndrome. *Clin Biochem.* (2022) Nov:S0009- 9120(22)002442.