

Laboratorio de Genética Molecular



El Laboratorio de Genética Molecular ha sido punto de referencia nacional para la formación de recursos humanos en las áreas de genética y biología molecular, aplicadas a las distintas disciplinas de la biología, la microbiología y la medicina. El objetivo central de la investigación de este grupo es la organización genómica y expresión genética en los protozoarios parásitos *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*, abarcando cuatro líneas fundamentales. La primera es el estudio de la organización y expresión de los genes ribosomales. El clonamiento y caracterización del ADN ribosomal de estos tres parásitos ha permitido identificar secuencias del espaciador intergénico que discriminan a nivel de especie, en el caso de *T. cruzi*, a nivel de subgénero en *Leishmania* y grupos dentro de la especie *T. rangeli*. Estas secuencias han sido utilizadas como herramientas taxonómicas en el ensayos diagnóstico de PCR que incluyen los parásitos *Leishmania garnhami*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis*, *T. cruzi* y *T. rangeli*.

El análisis de la expresión de los genes ribosomales por la ARN polimerasa I se ha concentrado en definir los elementos que controlan la terminación de la transcripción en *Leishmania*. Hemos identificado un elemento de 233 pb con actividad de atenuación de la

transcripción, independiente de la orientación. Producto de este trabajo se han derivado vectores de expresión en *Leishmania* los cuales han permitido la expresión *in vivo* de la proteína de fluorescencia verde (GFP) y la proteína de fluorescencia roja (DsRed) en *Leishmania*. Estas herramientas han sido aplicadas al estudio de la relación hospedador-parásito específicamente en la interacción insecto vector-promastigote. Siguiendo esta misma línea, recientemente hemos logrado expresar estos marcadores fluorescentes en formas epimastigotas de *T. cruzi* y *T. rangeli* e iniciado el estudio del desarrollo de estos parásitos en el hospedador invertebrado.

El estudio de los genes que codifican para enzimas de las vías glicolíticas, en particular los genes para piruvato quinasa y fosfofructoquinasa, constituye la segunda línea de trabajo. El estudio involucra la caracterización bioquímica de estas enzimas, así como el clonamiento, organización genómica y estudio de los mecanismos que controlan su expresión genética a los diferentes niveles en los dos estadios del ciclo de vida del parásito.

La tercera línea de investigación se enfoca en el estudio de la organización de la estructura de las regiones teloméricas y subteloméricas en el género *Leishmania* y *Trypanosoma*.

En este sentido se han diseñado estrategias novedosas para su clonamiento, obteniendo con éxito secuencias teloméricas para *L. donovani*, *T. cruzi* y *T. rangeli* las cuales han sido caracterizadas. La especificidad de especie de las regiones subteloméricas ha sido la base para el desarrollo de nuevas pruebas de PCR para la identificación y el diagnóstico de estos agentes patógenos

La cuarta línea de investigación es de reciente desarrollo. Hemos abordado el análisis molecular de la interacción parásito hospedador en el modelo *T. cruzi/T. rangeli*/triatomino. Ambos protozoarios comparten hospedadores vertebrados e invertebrados, sin embargo *T. cruzi* causa la enfermedad de Chagas y *T. rangeli* no es patógeno en humanos. En el vector el desarrollo de *T. cruzi* se limita al tubo digestivo mientras que *T. rangeli* invade hemolinfa, hemocitos, glándulas salivares y es transmitido por inoculación. Hemos llevado a cabo la construcción de genotecas de sustracción en dos direcciones, entre estas dos especies de Trypanosomas, con la finalidad de identificar genes de expresión diferencial que pudiesen estar asociados a las interacciones específicas de cada uno de estos parásitos con sus hospedadores vertebrado e invertebrado. En la actualidad llevamos a cabo la caracterización y secuenciación de los 521 clones obtenidos (245 clones de *T. rangeli* y 276 clones de *T. cruzi*).

Considerando la urgente demanda en técnicas de diagnóstico con alta especificidad, sensibilidad y pronta respuesta, hemos abierto una línea de trabajo centrada en la aplicación de nuevas tecnologías de diagnóstico, comunes para diferentes agentes infecciosos de interés en salud pública, basadas en amplificación de ADN en tiempo real. Como desarrollo piloto hemos adaptado al sistema PCR en tiempo real las pruebas de PCR para *Leishmania* (*Viannia*) y *Trypanosoma cruzi* inicialmente desarrolladas en nuestro laboratorio en formato tradicional, y hemos iniciado la incorporación de ensayos para el diagnóstico simultáneo de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* en muestras de niños provenientes del Hospital J.M. de los Ríos y Hospital Universitario. Esta última iniciativa está destinada a fortalecer la transferencia de nuevas tecnologías

desde grupos de investigación básica a centros de referencia comprometidos con el sistema de salud pública nacional.

Palmira Guevara. Jefa de Laboratorio. Profesor Asociado D.E. (1993). Honours Upper Second B.Sc. in Genetic and Microbiology (1980). Queen Mary College, Londres, Inglaterra, Reino Unido. Dr. en Biología Celular (1990). Postgrado en Biología Celular UCV . SPI I 1993 –2002. SPI II 2002.

José Luis Ramírez, Profesor Titular (1990). D.E. (Jubilado, 1994). Lic. en Biología, UCV (1969). Ph.D. en Biología Molecular (1977), The Johns Hopkins University. Baltimore, Estados Unidos de Norteamérica. SPI II. 1991 –2000. SPI III 2000.

Will Sandoval, Lic. en Biología (1997) de la UCV, estudiante del Postgrado de Biología Celular. Facultad de Ciencias. UCV.

María Teresa Abreu, Lic. en Biología (2001) de la UCV. Tesis de pregrado titulada: “Análisis *in vivo* de los elementos potencialmente terminadores de la transcripción de los genes ribosomales en *Leishmania amazonensis* ”. Actualmente estudiante del Postgrado de Biología Celular. Facultad de Ciencias. UCV.

Marlyn Puerta, Lic. en Bioanálisis (2001), de la UCV. Profesor Instructor de la Cátedra de Histología de la Escuela de Bioanálisis de la UCV y estudiante del Postgrado de Biología Celular. Facultad de Ciencias. UCV.

Priscilla Bastidas, Lic. en Bioanálisis (1995), UCV, estudiante de Maestría del Postgrado en Biología Celular. Facultad de Ciencias. UCV.

Manuel David Dias , Lic. en Biología (2001) de la UCV. Tesis de pregrado titulada: “Diseño de herramientas moleculares para el estudio de la interacción parásito-vector en infecciones mixtas de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* ”. Asistente de Investigación contratado por el proyecto S1-98002681 FONACIT.

Karlana Lara, Lic. en Biología (2004) de la UCV. Asistente de Investigación contratado por el Proyecto Red de Innovación Tecnológica, Identificación y Diagnóstico Molecular de Microorganismos, Iniciativa Científica Milenio.

Leandro Balzano, Lic. en Biología (2004) de la UCV. Asistente de Investigación contratado por Proyecto Red de Innovación Tecnológica Identificación y Diagnóstico Molecular de Microorganismos, Iniciativa Científica Milenio.

Evelyn Rodríguez, Estudiante de Pregrado. Tesista de la Licenciatura de Biología (Abril 2004).

Marjorie Sayeh, Estudiante de Pregrado. Tesista de la Licenciatura de Biología (Abril 2004).

Sergio Quispe, Pasante Programa UNU/BIOLAC, Institución de origen SELADIS, Bolivia. Abril-julio 2004.

Juana Vitelli de Flores, Lic. en Bioanálisis (1957) de la UCV. Bioanalista Especialista (1978). Personal contratado a Tiempo Convencional proyecto Fonacit S1-98002681.

Karin Castillo. Técnico en Relaciones Industriales (2001). Secretaria contratada por el Proyecto Red de Innovación Tecnológica Identificación y Diagnóstico Molecular de Microorganismos, Iniciativa Científica Milenio.

Emérita Díaz, Personal técnico contratado por el proyecto S1-98002681 FONACIT Abril 2000-2004.