

Respuesta de *T. spiralis* a cambios bruscos de temperatura y pH a través de las Hsp25, 60, 70 y 90

Response of *T. Spiralis* to abrupt changes of temperature and pH through of Hsp25, 60, 70 and 90

Autores: Luna Sánchez B*, Barbosa Cisneros OY**, Reveles-Espinoza AM***, Quiñonez-Bañuelos G****, Sánchez-Rodríguez SH*****

* Q.F.B. ** Doctora en Ciencias (Fisiología). *** Estudiante de Q.F.B. FCQ-UAZ. **** Estudiante de Q.F.B., FCQ-UAZ. ***** Doctor en Ciencias (Fisiología). Departamento de Biología Celular. Unidad Académica de Biología Experimental. Universidad Autónoma de Zacatecas.

Correspondencia: Dr. Sergio Hugo Sánchez Rodríguez. Fernando Villalpando #80, Col. Ramón López Velarde. Guadalupe, Zacatecas, México. C.P. 98600. Tel/Fax (492) 923-00-57. E-MAIL: smdck@hotmail.com

Resumen

Las proteínas de choque calórico (Hsp) se expresan de manera constitutiva en todas las células de un organismo y se sobreexpresan por una gran variedad de agentes estresantes como alteraciones en la temperatura y el pH. *Trichinella spiralis* es un nematodo que infecta el músculo de prácticamente todos los mamíferos y provoca la enfermedad llamada Triquinelosis. En el presente estudio se determinó, la expresión de las Hsp25, 60, 70 y 90 cuando el nematodo *T. spiralis* es sometido a diferente temperatura y pH. *T. spiralis* se obtuvo de ratas Long Evans por digestión artificial, posteriormente fueron sometidos a temperatura de 40, 21, 4, 0, -20, -50°C y pH de 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9. Después, fueron procesados para inmunofluorescencia, PAGE-SDS y Western blot. Se encontró: *T. spiralis* expresa en condiciones normales de temperatura (21°C) a las hsp25, 70 y 90, con un incremento en la expresión de la hsp25 cuando el nematodo es estresado a bajas temperaturas, mientras que a altas su expresión disminuye; la hsp70 y 90 se incrementa cuando el nematodo es estresado a altas y bajas temperaturas. Así mismo, se observó la expresión de la hsp60 a temperatura de -50°C. *T. spiralis* sometida a diferente pH reveló, que las Hsp25, 70 se sobreexpresa a un pH tanto ácido como básico, mientras que la hsp90 solamente se sobreexpresa a un pH ácido y disminuye su expresión a un pH básico. Conclusión: *T. spiralis* sobrevive a cambios bruscos de temperatura y pH ayudado por la expresión de las Hsp25, 60, 70 y 90.

Palabras clave: *T. spiralis*, proteínas de estrés calórico, temperatura, pH

Abstract

Heat shock proteins (Hsp) are expressed of constituent way in all the cells of an organism and they are over expressed by stress caused by a great variety of agents, like temperature and pH. *Trichinella spiralis* is a nematode that infects the muscle in most of the mammals caused Trichinelosis diseased. In the present study was determined the degree of expression of different size of proteins Hsp25, 60, 70 y 90 when *T. spiralis* is force under different temperature and pH conditions. *T. spiralis* were obtained from Long Evans rats by artificial digestion, later they were incubate under different temperatures 40, 21, 4, 0, -20, -50°C and diverse pH conditions of 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9. The samples were process for indirect immunofluorescence, analyzed by PAGE-SDS and Western blot. Results: *T. spiralis* in normal conditions at temperature of 21°C expresses Hsp25, 70 and 90, however there is an increase of Hsp25 expression when nematode is stressed to low temperatures and the expression decrease under high temperatures conditions; the expression of Hsp70 and Hsp90 increase when nematode is stressed in high and low temperatures. Our results show also the expression of Hsp60 in low temperatures of -50 °C. *T. spiralis* submit to different pH revealed that Hsp25 and 70 are over expressed to acidic and basic pH, while Hsp90 is only over expressed to acidic pH and decrease its expression to a basic pH. Conclusion: *T. spiralis* survives to abrupt changes of temperature and pH, supported by the expression of Hsp25, 60, 70 and 90.

Key words: *T. spiralis*, Heat shock protein, Temperature, and pH

Introducción

Las Zoonosis son enfermedades transmisibles entre los animales y el hombre.^[1,2] La triquinelosis fue descrita por Owen en 1835,^[3] es una enfermedad parasitaria causada por el nematodo *Trichinella spiralis*, infecta el músculo de prácticamente todos los mamíferos, se ha reportado en casi todo el mundo, su prevalencia es alta en Europa y Asia. La enfermedad en el ser humano, se asocia con la ingesta de carne infectada y sus productos crudos o mal cocidos, sobre todo de cerdo.^[4,5,6,7] El ciclo biológico de *T. spiralis* en mamíferos incluye 3 estadios; adultos, larva recién nacida (LRN) y larva infectante (LI).^[4,8]

Se ha observado que *T. spiralis* sobrevive a cambios ambientales adversos como son una baja de temperatura cuando el animal es sacrificado, cuando la carne infectada es almacenada ya sea por los comerciantes o las amas de casa a 4 y -20°C, además, *T. spiralis* sobrevive a temperaturas de cocción y freído, y más aún, sobrevive a cambios drásticos de pH en su paso por tracto digestivo del huésped al infectarlo, en el entendido de que no solo tiene una gran capacidad de supervivencia a cambios adversos, sino que presenta una alta infectividad, causando enfermedad.

Por lo anteriormente descrito, nos propusimos analizar las características fisiológicas de *T. spiralis*

que le confiere resistencia para sobrevivir a cambios adversos en su medio ambiente local, principalmente a diferente temperatura y cambios en el pH. Para ello nos enfocamos al estudio de las proteínas de choque calórico (Hsp), que se expresan de manera constitutiva en todas las células tanto procariotas como eucariotas.^[9,10,11,12,13,14]

Estas Hsp se sobreexpresan cuando ocurren cambios en el medio ambiente local de las células de todos los organismos tanto inferiores como superiores, es decir, se sobreexpresan en respuesta al estrés.^[15,16] Dentro de los estresores que inducen la síntesis de las Hsp están: la hipoglucemia, la anoxia, el calor, el etanol, el peróxido de hidrógeno, iones de metales pesados, arsenicales, infecciones con ciertos virus,^[17,18] enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico,^[19] por privación de agua y alimento,^[20] radiación ultravioleta, radiación electromagnética de baja frecuencia y los campos intensos de radiación gamma,^[21,22] los rayos gamma de baja intensidad, entre otros.^[23] La función de las Hsp es proteger a la célula del daño producido por el estrés, mediante la unión a proteínas parcialmente desnaturalizadas, disociando agregados de proteínas y regulando el doblado correcto y la traslocación intracelular de proteínas sintetizadas de novo.^[24]

La familia de las Hsp está altamente conservada en todos los organismos. Se han clasificado en seis familias de acuerdo a su peso molecular: a).- Las Hsp de 100-110 kDa, b).- Las Hsp de 83-90 kDa. c).- Las Hsp de 66-78 kDa, d).- Las Hsp de 60 kDa, e).- Las Hsp pequeñas de 13-25 kDa. [13,14,25,26]

En el contexto fisiológico, las proteínas Hsp juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis celular bajo condiciones normales, como condiciones de estrés. [9,26,27,28] Bajo condiciones normales, las Hsp tienen influencia en la síntesis, transporte y degradación de proteínas; [29,30] bajo condiciones de estrés, actúan como moléculas chaperonas. [31] Cabe señalar que la sobreexpresión de chaperonas moleculares incluyendo miembros de la familia de Hsp70 y pequeñas proteínas de estrés en *Drosophila* y *C. elegans* han mostrado que extienden la duración de la vida de estos organismos. Además, recientes estudios han implicado a los factores de shock térmico (HSF) como reguladores de la longevidad. [32,33,34]

Proteínas Hsp en *T. spiralis*

Se conoce que los parásitos están sometidos a varios estresores impuestos por el huésped; una vez que han penetrado en él, hay condiciones adversas como el calor o ambientes oxidativos que deben ser superados; [35,36] por consiguiente estos parásitos

han desarrollado estrategias de supervivencia morfológicas y fisiológicas. Algunos autores indican un importante papel de las Hsp en los cambios morfológicos del parásito y en su resistencia a estresores. [37,38,39,40] La inducción de las Hsp ha sido relacionada incluso con el incremento de la virulencia en algunos parásitos. [41,42]

Las fluctuaciones en el nivel de Hsp están relacionadas con la viabilidad e infectividad de las larvas, ya que en condiciones de estrés, la homeostasis es sostenida a través del incremento en el nivel de Hsp70, cuando se pierde la infectividad, los niveles de Hsp son alterados considerablemente, la homeostasis puede no ser perdida puesto que la viabilidad no decrece. El decremento en los niveles constitutivos de Hsp70 y Hsp90 puede ser un indicador de muerte celular programada conocida como apoptosis. [43] De hecho la inducción de Hsp70 y Hsp90 ha sido asociada con una supresión de apoptosis en muchos estudios. [44,45] Es clara la relación existente entre la reducción en los niveles de Hsp70 y Hsp90 y el decremento de la viabilidad e infectividad de las larvas.

Además, en algunos estudios se ha observado que a temperaturas bajas se reduce el efecto perjudicial del estrés oxidativo; el calor no induce incremento en los niveles de Hsp60/Hsp70 ni reduce la infectividad; incrementos en los niveles de Hsp inducidos por estrés

oxidativo pueden causar baja infectividad. [46]

Con respecto a la termotolerancia, a bajas temperaturas *Trichinella spp.*, tiene varias implicaciones, una de ellas es que las LI de todas las especies deben tener una habilidad para resistir la exposición a temperaturas bajas, que ocurre en un huésped infectado después de muerto. De hecho, la biología de la *Trichinella* y su distribución a nivel mundial sugieren que la LI tiene una tolerancia genéticamente determinada a cambios de temperatura según la región. Hay *Trichinella spp.* típicas de ciertas regiones, por ejemplo, en el ártico *T. nativa*, en ambiente tropical *T. nelsoni*, y la *T. spiralis*, cosmopolita. [47,48]

Las Hsp a pesar de su naturaleza altamente conservada, pueden ser altamente inmunogénicas. [49,50] Por lo anterior y debido a todas sus funciones vitales, las Hsp se utilizan como marcadores de daño por estrés en enfermedades, [51,52,53] en estudios de eficacia de drogas, [54] en estudios ecotoxicológicos, [55] y como constituyente de vacunas. [39] La cuantificación seguida por la comparación de los niveles de Hsp puede ser realizada para todos los organismos y tejidos de donde se puedan obtener biopsias. Esto permitirá el diagnóstico del daño producido por el estrés en el tejido, y en particular durante la infección, pero también permitirá el monitoreo de la progresión

o resolución de una parasitosis durante el tratamiento. [52] En un reciente estudio de expresión de Hsp60, Hsp70 y Hsp90 en órganos de ratas con re-infección de *Trichinella spiralis*, [56] se observó que contrariamente a la infección primaria de las ratas [52] no exhiben ningún aumento en la expresión de Hsp. La insensibilidad de las Hsp en las ratas re-infectadas parece estar relacionado con la inmunidad adquirida. Con lo anterior es probable que las Hsp60, Hsp70 y Hsp90 sean el blanco de la respuesta inmune del huésped en la infección por este nematodo. [50]

En el proceso de infección, las Hsp de los parásitos, juegan un papel central en la adaptación y diferenciación del parásito y en la protección de los mecanismos de muerte del hospedero al parásito, como son metabolitos reactivos y bajo pH. Mas aún, las Hsp del parásito *Trichinella* y en especial la Hsp70 es conocida como una proteína altamente inmunogénica. [50,57]

Se ha observado que la larva infectante de *T. spiralis* cuando es expuesta a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y frío, expresa la Hsp50, [58] y al ser expuesta a peróxido de hidrógeno al 1% y 2% se provoca un incremento de las Hsp60, 70 y 90. [59] Cuando *T. spiralis* es expuesta a 4°C, sobreexpresa la Hsp70, sin cambios en la expresión de la Hsp60 y una disminución de la Hsp90 [60]. Cuando *T. spiralis* es tratada con antihelmínticos,

no se han observado cambios en la expresión de las Hsp60, 70 y 90, salvo para la Hsp50 que disminuye su expresión cuando *T. spiralis* es tratada con mebendazol. [59]

Por lo anterior, es importante investigar los mecanismos de adaptación del nematodo *T. spiralis*, debido a que puede infectar a un número variado de huéspedes, por lo que el estudio fisiológico-adaptativo de *T. spiralis* puede proveer información sobre los mecanismos que ayudan al establecimiento y permanencia de la enfermedad causada por este parásito.

En el presente estudio se determinó, cuales son las Hsp que expresa el nematodo *T. spiralis*, que le permiten adaptarse a diferentes cambios como son temperatura y pH durante el proceso de implante en un huésped y así causar enfermedad.

El objetivo del trabajo fue: determinar la expresión de las proteínas Hsp25, 60, 70 y 90 cuando el nematodo *T. spiralis* es sometido a diferente temperatura (40, 21, 4, 0, -20, -50°C) y diferente pH (2, 3, 4, 5, 7, 8, 9).

Material y métodos

Lugar de realización del trabajo: El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Celular de la Unidad Académica de Biología Experimental de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

Nematodos de *T. spiralis*. Para mantener la cepa de *T. spiralis*, se

utilizaron ratas Long Evans hembras con una edad promedio de dos meses y medio, con un peso aproximado de 250 gramos. Cada animal fue infectado con 500 LI de *T. spiralis* por vía oral (trozo de carne infectada)(Xenodiagnóstico). Los animales se mantuvieron en condiciones normales de bioterio.

Obtención de LI por la Técnica de Digestión Artificial:

Las LI viables se obtuvieron del músculo de ratas Long Evans infectadas con *T. spiralis* por seis semanas, las cuales al sacrificarlas, se obtuvo el tejido muscular que fue molido (pierna, masetero, lengua, diafragma e intercostales). Se pesaron 60 gramos de carne y se colocaron en un costal de tela de tul, el cual se introdujo en un embudo de separación para ser sometida a digestión con jugo gástrico artificial, preparado con 1 litro de agua destilada conteniendo pepsina a una concentración de 10,000 U, 3% de HCL 0.2 N (pepsina 3.5 grs. más 7 ml de HCL), teniéndolo en incubación por 24 horas a 37° C para después recolectar el paquete larvario, mismo que fue resuspendido en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS; pH de 7.2) (Gibco BRL, Grand Island NY, USA, 21300-58). [61]

Inducción de estrés: El paquete larvario se dividió en 14 partes iguales, 1 como control, 6 fueron sometidas a diferentes temperaturas (-50, -20, 0, 4, 21, 40°C) en medio de cultivo RPMI (Gibco BRL, Grand Island NY, USA, 11875-093), y las otras 7 se estresaron

con jugo gástrico artificial a diferente pH (2, 3, 4, 5, 7, 8, 9) todos a un tiempo de 3 horas y a 37°C.

Lisis de los nematodos y PAGE-SDS:

Los nematodos de *T. spiralis* sometidos a estrés a diferente temperatura y diferente pH, se lavaron 3 veces con solución de fosfatos salinos (PBS; pH de 7.2) (Gibco BRL, Grand Island NY, USA, 21300-058), se le añadió 1 ml. de buffer de lisis que contiene: Triton X-100 al 1%, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.6 e inhibidor de proteasas 1 mM, PMSF (Sigma Chemical Co, St Louis MO, USA, P-7626). En frío, las larvas en el buffer de lisis se homogenizaron en un mortero. El lisado se centrifugó por 10 minutos a 1600 g y el sobrenadante fue recuperado y se determinó la concentración de proteínas.^[62] La cuantificación de proteína se realizó mediante la técnica descrita por Bradford (1976)^[63]. De cada condición experimental, 30 µg de proteína se caracterizaron en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS al 12.5%) de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (1970).^[64]

Western Blot y análisis: Las proteínas en los geles de poliacrilamida-SDS fueron transferidas a papel de nitrocelulosa (Amersham Laboratories, Buckinghamshire, England, RPN303C), como describió Towbin (1979).^[65] Después, para identificar a las proteínas Hsp, el blot fue tratado con anticuerpos monoclonales específicos contra las

proteínas Hsp25, 60, 70 y 90 (Sigma Chemical Co, St Louis MO, USA, I-1395, T-6674, H-4149, H-5147) con una dilución 1:1000. Un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma Chemical Co, St Louis MO, USA, A-9044) dilución 1:1500, es usado como segundo anticuerpo, seguido por un sistema de detección quimioluminiscente (ECL, RPN2106, Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, England), que fue detectado en una película radiográfica BioMax (Eastman Kodak Co, Rochester, NY, USA, 870-1302) en un tiempo de 1 minuto.

Determinación de la cantidad de Hsp: Las autorradiografías obtenidas por el método de ECL se analizaron por densitometría (Eagle Eye, Stratagene Mitsubishi), con el fin de cuantificar la cantidad de proteína. El valor de 21°C fue tomado como condición control de temperatura y 7 el valor control de pH (valor neutro).

Inmunofluorescencia: Las larvas obtenidas por digestión artificial y sometidas a diferente temperatura y pH, se lavaron 5 veces con PBS, bloqueadas con suero fetal bovino (SFB) al 3% en PBS por 30 minutos e incubadas por 1 hora con anticuerpos específicos contra las Hsp25, 60, 70 y 90 (I-1395, T-6674, H-4149, H-5147, Sigma Chemical Co, St Louis MO.) diluidos a 1:500 en 3% de SFB-PB. Después del lavado, la incubación del primer anticuerpo es seguido por el

segundo anticuerpo (1:100, F-9137: FITC sheep anti-mouse; Sigma Chemical Co., St Louis MO.) por 1 hora a temperatura ambiente. Después de 5 lavados con PBS, las larvas fueron colocadas en portaobjetos, se les colocó un cubreobjetos y se analizaron por microscopía confocal (Carl Zeiss, Axiovert 200M).

Análisis estadístico: Las bandas de proteína Hsp25, 60, 70 y 90 obtenidas bajo las condiciones de estrés por temperatura y pH que fueron analizadas por densitometría, los resultados obtenidos fueron expresados como media \pm s.e.m., donde n es el número de observaciones.

Discusión

En nuestra investigación, las larvas infectantes de *T. spiralis* fueron expuestas a varios estresores, simulando los impuestos por el mismo huésped o bien, por el manejo de la carne desde el sacrificio de un animal infectado hasta su almacenamiento. Lo anterior se justifica debido a que *T. spiralis* sobrevive a cambios adversos de temperatura por almacenamiento o cocción, y variaciones en el pH durante el paso por tracto digestivo de un huésped, y así causar enfermedad.

En el presente estudio se analizaron las proteínas de choque calórico (Hsp) que expresa el nematodo *T. spiralis*, y que de manera fisiológica le permiten adaptarse a cambios como son temperatura y pH durante el

proceso de implante en un huésped, causando enfermedad, por lo que el objetivo del presente trabajo fue: determinar el grado de expresión de las proteínas Hsp25, 60, 70 y 90 cuando el nematodo *T. spiralis* es sometido a diferente temperatura (40, 21, 4, 0, -20, -50°C) y diferente pH (2, 3, 4, 5, 7, 8, 9). El analizar cambios en el pH es debido a que en el tejido infectado se tiene un pH y al ser ingerido por un huésped a lo largo del tracto digestivo se presentan diferentes pH.

Al analizar por Western blot a las proteínas Hsp constitutivas de *T. spiralis* a temperatura ambiente (21°C), encontramos que expresa en mayor proporción la Hsp25, le sigue la Hsp90, y en menor cantidad la Hsp70. Es normal haber encontrado la expresión de algún miembro de la familia de las Hsp en *T. spiralis*, ya que se conoce que se expresan prácticamente en todas las células vivas, tanto procariotas como eucariotas y que tienen funciones esenciales bajo condiciones de desarrollo normal como es el plegado correcto de proteínas durante su síntesis, transportar de un compartimiento subcelular a otro y ayudar en la degradación de proteínas entre otras funciones. ^[9,13,14,15,66] Bajo esta condición experimental, no se encontró la expresión de la Hsp27 y 60.

La localización de las Hsp25, 70 y 90 analizada por inmunofluorescencia utilizando microscopía confocal, fue de manera homogénea en esófago,

cavidad celómica y cutícula para la Hsp25; la localización de Hsp70 fue homogénea principalmente en esófago y cutícula; y la Hsp90 la encontramos homogénea principalmente en cavidad celómica.

Al estresar *T. spiralis* a diferentes temperaturas y analizar cambios en la expresión de las Hsp, encontramos que existe un incremento de la Hsp25 conforme *T. spiralis* se somete a bajas temperaturas (4, 0, -20, -50), en cambio a altas (40°C), se reduce su expresión. Lo anterior corresponde con lo reportado en organismos multicelulares, donde las smHsp son las proteínas de estrés calórico que más se induce su expresión por condiciones estresantes, pero también están sujetas a la expresión regulada durante el desarrollo en ausencia de estrés, demostrado en estudios de *Drosophila*.^[67]

En el presente estudio, la sobreexpresión de la Hsp70 se da por calor (40°C) o por frío (-50°C). Se ha reportado que la Hsp70 se encuentra en todos los organismos estudiados, desde bacterias, levaduras y el hombre, localizadas de manera ubicua en las células, cuya función principal es en el transporte y la unión a proteínas desdobladas y su corrección.^[68] Durante el estrés por calor u otro tipo de estresores, la Hsp70 es una proteína inducible, ayudando al plegado correcto de proteínas parcialmente

desnaturalizadas, y disociando agregados de proteínas.^[13,14] La Hsp70 fue la primera proteína observada como inducible por estresores como el calor entre otros.^[13] Además, se ha encontrado que durante el choque térmico se protege selectivamente a las mitocondrias con una correlación estrecha entre el grado de protección mitocondrial y la concentración de Hsp70.^[69] Esta protección es confirmada en ratas expuestas a choque térmico previo a una perfusión cardiaca con peróxido de hidrógeno, donde provocó aumento en la concentración de Hsp70.^[36]

En el presente estudio, el comportamiento de la Hsp90 es sobreexpresarse ya sea por frío o por calor, y entre sus funciones se ha encontrado que ayuda a prevenir el agrupamiento de otras proteínas que están desplegadas debido a incrementos en la temperatura u otro tipo de estresor, también se asocia a componentes celulares como los receptores de hormonas esteroideas,^[70] así mismo juega un papel crucial en la regulación de enzimas y transcripción de proteínas dentro de la célula.^[71]

Uno de los hallazgos mas relevantes de la presente investigación fue que bajo la condición experimental de -50°C, aparece la expresión de la Hsp60. Mencionamos antes el papel que juegan la Hsp70 y Hsp90 en el doblado de proteínas en células sometidas a estrés, lo que

junto con la expresión de la Hsp60 y la Hsp10, ayuda bajo las mismas condiciones a la supervivencia celular, ya que funciona como chaperona que facilita el doblado y renaturalización de proteínas en células sometidas a estrés, así mismo, su función a nivel mitocondrial es en el transporte de proteínas, en donde la Hsp60 y Hsp70 facilitan el tráfico bidireccional entre la mitocondria y el citoplasma, sin dejar de mencionar su función en la respuesta inmune, ya que la Hsp60 tiene propiedades inmunodominantes, [67] siendo todas estas características un punto importante en la ayuda para contrarrestar el estrés.

La expresión de las Hsp por cambios de temperatura fue analizado por inmunofluorescencia utilizando microscopía confocal, con el propósito de analizar posibles cambios en la localización de las Hsp en *T. spiralis*. En general, se encontró que la localización de la Hsp es homogénea en esófago, cavidad celómica y cutícula cuando tenemos temperatura de 21°C, y conforme se disminuye la temperatura, este patrón llega a ser a lo largo del parásito de manera homogénea, difusa y de puntillero.

Así mismo, al analizar por Western blot la expresión de las Hsp cuando *T. spiralis* es sometida a diferente pH, encontramos que las Hsp25, 70 y 90 se expresan a diferente pH, donde las Hsp25 y 70 se sobreexpresan a un pH tanto ácido

como básico, mientras que la Hsp90 solamente se sobreexpresa a un pH ácido y disminuye su expresión a un pH básico. La distribución de las Hsp bajo las condiciones estresantes de pH es a lo largo de todo el nematodo similar a la encontrada a temperatura ambiente de 21°C.

Podemos concluir, que los nematodos sobreviven a cambios bruscos de temperatura y pH ayudados por la expresión de cuatro proteínas del estrés calórico, la Hsp25, 60, 70 y 90, y otras proteínas aún no caracterizadas.

Es importante hacer un análisis más profundo sobre los mecanismos que utiliza *T. spiralis* para implantarse en un huésped y causar enfermedad. Los aspectos más importantes de nuestro estudio, es acerca de la supervivencia del nematodo a temperaturas extremas y a cambios en el pH.

Es crucial seguir estudiando sobre los mecanismos de adaptación y supervivencia de este nematodo debido a la expresión y sobreexpresión de las proteínas de estrés calórico, así como analizar la variación de estas proteínas durante diferentes procesos de preacondicionamiento a estresores como la temperatura y variaciones en el pH, junto o en paralelo con los de evasión de la respuesta inmune del huésped.

Agradecimientos

Archivos de Medicina ©

<http://archivosdemedicina.com>

Apoyo del CONACYT. Dr. Sergio Hugo
Sánchez Rodríguez. Contrato: 499100-
5-I31456-N.

REFERENCIAS

1. Schwalbe CW. Medicina veterinaria y salud pública. México, DF. Editorial Novaro. 1969.
2. Martínez-Conde J. Guía del inspector veterinario titular. 2- Epizootiología y zoonosis. Barcelona: Biblioteca Veterinaria Aedos. 1975.
3. Owen R. description of a microscopic entozoan infesting the muscle of the human body. Trans. Zool. Soc. 1835;1:315-324.
4. Despommier D, Gwadz WR, Hotez JP. Parasitic disease. Springer Verlag. Third edition. 1994. pp: 32-40.
5. Álvarez de Sotomayor RMB. La Triquinosis, Revista de Ciencias Naturales. 2005;2.
6. Krivokapich SJ, Molina V, Bergagna HF, Guarnera EA. Epidemiological survey of Trichinella infection in domestic synanthropic and sylvatic animals from Argentina. J. Helminthol. 2006;80(3):267.
7. Reiterova K, Kincekova J, Snabel V, Marucci G, Pozio E, Dubinsky P. Trichinella spiralis-outbreak in the Slovak Republic. Infection. 2007;35(2):89-93.
8. Despommier D. *Trichinella spiralis*. Apple Trees Productions, New York, 2004.
9. Lindquist S. The heat shock response. Annual Review of Biochemistry. 1986;55:1151-1191.
10. Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. Annu. Rev Genet. 1988;22:631-637.
11. Morimoto RI, Milaski KL. Stress Proteins in Biology and Medicine. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. 1990. pp. 1-36.
12. Welch WJ. Stress Proteins in Biology and Medicine, Morimoto RI., et al., (eds). Cold Spring Harbor Lab. Cold spring Harbor, N.Y. 1990. pp:223-278.
13. Hendrick JP, Harti FU. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. Annual Review of Biochemistry. 1993;62:349-384.
14. Harti FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature. 1996;381:571-580.
15. Ciocca DR, Oesterreich S, Chammess GC, McGuire WL, Fuqua SAW. Biological and clinical implications of heat shock protein 27000 (Hsp27): a review. Journal of National Cancer Institute. 1993;85:1558-1569.
16. Lin H, Li H, Blank M, Head M, Goodman R. Magnetiv field activation of protein-DNA Binding. Journal of Cellular Biochemistry 1998;70:279-303.
17. Guerreiro V. Jr, Raynes DA. Synthesis of heat stress proteins in lymphocytes from livestock. J. Anim. Sci. 1990;68:2779.
18. Bañuelos-Valenzuela R, Sánchez-Rodríguez SH. La proteína de estrés calórico hsp70 funciona como un

- indicador de adaptación de los bovinos a las zonas áridas. REDVET. 2005.VI(3).
19. Villalobos-Hurtado R, Sánchez-Rodríguez SH, Avalos-Díaz E, Herrera Esparza R. Possibile ruolo di hsp70 nel trasporto di autoantigeni alla giunzione dermo-epidermica nel lupus eritematoso sistemico. possible role of hsp70 in autoantigen shuttling to the dermo-epidermal junction in systemic lupus erythematosus. Reumatismo. 2003;55(3):155-158
20. Barajas-Vásquez GE, Baldwin-Sevilla C, Barbosa-Cisneros OY, Sánchez-Rodríguez SH. Las proteínas de estrés calórico hsp60, 70 y 90 participan en la adaptación de los caprinos a las zonas áridas. REDVET. 2005. VI(3).
21. Saran M, Bors W. Radiation chemistry of physiological saline reinvestigated: evidence that chloride-derived intermediates play a key role in cytotoxicity. Radiation Research. 1997;147:70-77.
22. Feder EM, Hoffmann EG. Heat-Shock proteins, molecular Chaperones, and the stress response: Evolutionary and Ecological physiology. Annu Rev. Physiol. 1999;61:243-282.
23. Vega-Carrillo HR, Bañuelos-Valenzuela R, Manzanares-Acuña E, Sánchez-Rodríguez SH. Response of Human Lymphocytes to low gamma ray doses. Alasbimn Journal. 2001;3(12).
24. Goodman R, Blank M. Magnetic field stress induces expression of Hsp 70. Cell Stress & Chaperones. 1998;3(2):79-88.
25. Hass YG. BiP-A Heat Shock Protein involved in immunoglobulin chain assembly. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1991;167:71.
26. Leppa S, Sistonen L. Heat shock response pathophysiological implications. Annals of Medicine. 1997;29:73-78.
27. Schlesinger M.J. Heat shock proteins. J Biol Chem. 1990;265:12111-12114.
28. Welch W.J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins and implications for medicine and diseases. Physiol Rev. 1992;4:1063-1081.
29. Terlecky SR. Hsp70s and lysosomal proteolysis. Experientia. 1994;50:1021-1025.
30. Beissinger M, Buchner J. How chaperones fold proteins. Biol Chem. 1998;379:245-259.
31. Forreiter C, Nover L. Heat induced stress proteins and the concept of molecular chaperones. J Biosci. 1998;23:287-302.
32. Tatar M, Khazaeli AA, Curtsinger JW. Chaperoning extended life. Nature. 1997;390,30.
33. Yokoyama K, Fukumoto K, Murakami T, Harada S, Hosono R,

- Wadhwa R, Mitsui Y, Ohkuma S. Extended longevity of *Caenorhabditis elegans* by knocking in extra copies of Hsp70F, a homolog of mot-2 (mortalin)/mtHsp70/Grp75. FEBS Lett. 2002; 516:53–57.
34. Walker G.A. y Lithgow G.J. Lifespan extension in *C. elegans* by a molecular chaperone dependent upon insulin-like signals. Aging Cell. 2003; 2,131.
35. Callahan HL, Crouch RK, James ER. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidant?. Parasitol Today. 1988; 4:218-225
36. Polla S.B. Heat shock proteins in host-parasite interactions. Immunol Today. 1991; 3:38-41.
37. Hunter KW, Cook CL, Hayunga EG. *Leishmania* differentiation in vitro: induction of heat shock proteins. Biochem Biophys Res Comm. 1984; 125:755-760
38. Van der Ploeg LHT, Giannini SH, Cantor CR. Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. Science. 1985; 228:1443-1446
39. Newport GR. Heat shock proteins as vaccine candidates. Immunology. 1991; 3:17-24
40. Van Leeuwen MAW. Heat-shock and stress response of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. Parasitol Res. 1995; 81:706-709
41. Smejkal RM, Wolff R, Olenick JG. *Leishmania braziliensis panamensis*: increased infectivity resulting from heat shock. Exp Parasitol. 1988; 65:1-9.
42. Buchmeier NA, Heffron F. Salmonella proteins induced following phagocytosis by macrophages are controlled by multiple regulons. Science. 1990; 248:730-732
43. Martínez J, Perez SJ, Bernadina WE, Rincón I, Rodríguez CF. Heat shock protein synthesis over time in infective *Trichinella spiralis* larvae raised in suboptimal culture conditions. Journal of Helminthology. 2004; 78:243–247.
44. Samali A, Orrenius S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. Cell Stress and Chaperones. 1998; 3:228-236.
45. Vayssier M, Polla BS. Heat shock proteins chaperoning life and death. Cell Stress and Chaperones. 1998; 3:221–227.
46. Martínez J, Rodríguez CF. Relationship between heat shock protein levels and infectivity in *Trichinella spiralis* larvae exposed to different stressors. Parasitol Res. 2005; 97(3):213-8.
47. Rausch RL. Trichinosis in the artic. In "Trichinosis in Man and Animals" (S.E. Gould, Ed.). Thomas, Springfield, IL. 1970. pp. 348-373.
48. Sokolova LB. The effect of temperature on the viability of

- different species of *Trichinella*. *Vopr. Prirod. Ochagov. Bolez.* 1979;10:185-187.
49. Del Giudice G. HSP70: a carrier molecule with built-in adjuvanticity. *Experientia.* 1994;11/12:1061-1066
50. Martínez J, Pérez SJ, Bernadina W, Rodríguez CF. HSP60, HSP70 and HSP90 from *Trichinella spiralis* as targets of humoral immune response in rats. *Parasitology Research.* 2001;87(6):453 – 458.
51. Macario AJL. Heat-shock proteins and molecular chaperones: implications for pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Int J Clinical Lab Res.* 1995;25:59-70
52. Martínez J, Pérez SJ, Bernadina W, Rodríguez CF. Influence of parasitization by *Trichinella spiralis* on the levels of heat shock proteins in rat liver and muscle. *Parasitology.* 1999a;118:201-209.
53. Merino S, Martínez J, Barbosa A, Møller AP, de Lope T, Pérez J, Rodríguez CF. Increase in a heat shock protein from blood cells in response of nestling house martins (*Delichon urbica*) to parasitism: an experimental approach. *Oecologia.* 1998;116:343-347.
54. Tosi P, Visani G, Ottaviani E, Gibellini D, Pellacani A, Tura S. Reduction of heat-shock protein-70 after prolonged treatment with retinoids: biological and clinical implications. *Am J Hematol.* 1997;56:143-150.
55. Eckwert H, Alberti G, Koehler HR. The induction of stress proteins (HSP) in *Oniscus asellus* (Isopoda) as a molecular marker of multiple heavy metal exposure: I. Principles and toxicological assessment. *Ecotoxicology.* 1997;6:249-262
56. Martínez J, Pérez SJ, Bernadina W, Rodríguez CF. Using heat shock proteins as indicators of the immune function in Wistar rats during a secondary *Trichinella spiralis* infection. *Vet Parasitol.* 1999b;85:269-275.
57. Ko RC, Fan L. Heat shock response of *T. spiralis* and *t. pseudospiralis*. *Parasitol.* 1996;112:89-95.
58. Martínez J, Pérez-Serrano J, Bernadina WE. Oxidative and cold shock enhanced induction of a 50kDa stress protein in *Trichinella spiralis*. *Parasitol Res.* 2002;88:427-430.
59. MARTINEZ J, PEREZ-SERRANO J, BERNARDINA WE, RODRIGUEZ-CAABEIRO F. Oxidative, Heat and Anthelmintic Stress Responses in Four Species of *Trichinella*: Comparative Study. *Journal of Experimental Zoology.* 2002; 293: 664-674
60. Martinez J, Perez-Serrano J, Bernadina WE, Rodriguez-Caabeiro F. Stress Response to Cold in *Trichinella* Species. *Cryobiology.* 2001;43:293-302.
61. Del Río A, Herrera RM, Herrera R. "Triquinosis experimental I:

- extracción de antígenos y procedimiento para detectar anticuerpos", Arch. Invest. Med. 1986;17:359-367.
62. Harlow E, Lane D. Antibodies a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y. 1988.
63. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical. Biochemistry. 1976;72:248-254.
64. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London). 1970;227:680-685.
65. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels nitrocellulose sheets: procedure and applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979;76:4350-54.
66. Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. J. Natl. Cancer Inst. 2000;92:1564-72.
67. Arrigo, AP, Landry J. Expression and function of the low molecular weight Heat Shock Proteins. The Biology of heat shock proteins and molecular chaperones. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1999. pp. 335-373.
68. Kopecek P, Altmannova K, Weigl E. Stress proteins: Nomenclature, division and functions. Biomed. Papers.2001;145(2):39-47.
69. Lill R, Neupert W. Mechanism of protein import across the mitochondrial outer membrane. Trends Cell Biol. 1996;6:56-61.
70. Pennisi E. Expanding the eucariotes cast of chaperones. Research News Science. 1996;272:1613-1614.
71. Georgopoulos C, Welch WJ. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. Annual Review of Biology. 1993;9:601-634