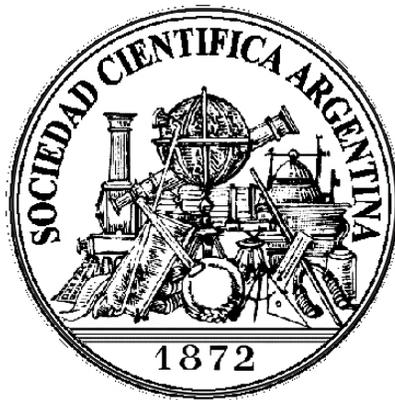


ANALES
DE LA
SOCIEDAD CIENTIFICA
ARGENTINA

AÑO 2018 - VOLUMEN 261 - N° 1

Indizada en Biodiversity Heritage Library, Smithsonian Institute (USA),
en el Natural History Museum Library (UK) y en la
Ernst Mayr Library de Harvard University (USA).



Avda. SANTA FE 1145
C1059ABF BUENOS AIRES - ARGENTINA
Correo Electrónico: sociedad@cientifica.org.ar
www.cientifica.org.ar

EX PRESIDENTES DE LA SOCIEDAD CIENTIFICA ARGENTINA

1872-1874	Ing. Luis A. Huergo	1919-1923	Ing. Santiago E. Barabino
1874-1875	Dr. Juan J. J. Kyle	1923-1927	Ing. Eduardo Huergo
1875-1877	Ing. Pedro Pico	1927-1929	Ing. Nicolás Besio Moreno
1877-1878	Ing. Guillermo White	1929-1933	Dr. Nicolás Lozano
1878-1879	Ing. Luis A. Huergo	1933-1937	Ing. Nicolás Besio Moreno
1879-1880	Dr. Valentín Balbín	1937-1943	Ing. Jorge W. Dobranich
1880-1881	Dr. Carlos Berg	1943-1946	Dr. Gonzalo Bosch
1881-1882	Ing. Luis A. Huergo	1946-1949	Ing. José M. Páez
1882-1883	Dr. Carlos Berg	1949-1951	Ing. Dr. Eduardo María Huergo
1883-1885	Ing. Guillermo White	1951-1956	Dr. Abel Sánchez Díaz
1885-1886	Ing. Luis A. Viglione	1956-1959	Dr. Eduardo Braun Menéndez
1886-1887	Dr. Estanislao S. Zeballos	1959-1962	Ing. Pedro Longhini
1887-1889	Dr. Valentín Balbín	1962-1964	Dr. Pablo Negroni
1889-1891	Dr. Carlos Maria Morales	1964-1970	Ing. José S. Gandolfo
1891-1892	Ing. Eduardo Aguirre	1970-1976	C. de Nav. Emilio L. Díaz
1892-1893	Dr. Juan J. J. Kyle	1976-1988	Ing. Agr. Eduardo Pous Peña
1893-1894	Ing. Carlos Bunge	1988-1989	Ing. Augusto L. Bacqué
1894-1895	Ing. Miguel Iturbe	1989-1992	Ing. Lucio R. Ballester
1895-1896	Dr. Carlos Maria Morales	1993-1999	Dr. Arturo Otaño Sahores
1896-1897	Dr. Angel Gallardo	1999-2001	Dr. Andrés O. M. Stoppani
1897-1898	Ing. Domingo Nocetti	2001-2005	Dr. Alfredo Kohn Loncarica
1898-1900	Ing. Dr. Marcial R. Candiotti	2005-2009	Dr. Jorge R. A. Vanossi
1900-1901	Dr. Manuel B. Bahía	2009-2013	Dr. Angel Alonso
1901-1902	Dr. Carlos Maria Morales	2013-2017	Dr. Eduardo A. Castro
1902-1903	Ing. Carlos Echagüe		
1903-1904	Ing. Emilio Palacio		
1904-1906	Dr. Carlos Maria Morales		
1906-1908	Ing. Gral. Arturo M. Lugones		
1908-1909	Ing. Otto Krause		
1909-1910	Ing. Vicente Castro		
1910-1911	Dr. Francisco P. Moreno		
1911-1912	Ing. Vicente Castro		
1912-1913	Gral. Dr. Agustín Alvarez		
1913-1914	Ing. Santiago E. Barabino		
1914-1915	Dr. Francisco P. Lavalle		
1915-1917	Ing. Nicolás Besio Moreno		
1917-1919	Dr. Carlos Maria Morales		

“LAS CUCARACHAS Y LA ALERGIA: 40 AÑOS DE INVESTIGACIÓN.”

Ángel Alonso, Julio F. Albónico, Krikor Mouchián, Carlos H. Pionetti, Luis M. Scavini (†), Santiago R. Rodríguez, Sara M. Rodríguez, Silvia G. Irañeta, Mariana Potenza.

División Alergia e Inmunología.- Centro de Medicina Nuclear.- Hospital de Clínicas José de San Martín.- CONEA.- 2da Cátedra de Microbiología.-Facultad de Medicina.- UBA.-

Resumen: Se exponen los datos hallados en el estudio físico-químico de las estructuras quitinosas de las cucarachas *Periplaneta americana* (**Pa**) y *Blatella germanica* (**Bg**), así como su capacidad sensibilizante en sujetos atópicos generando anticuerpos específicos del isotipo IgE. Se analizan las estrategias para interferir dicha hipersensibilidad induciendo la síntesis de anticuerpos IgG de mayor avidéz por los péptidos inmuno-dominantes de las **Pa** y **Bg**. Se valoran estadísticamente los resultados con la inmunoterapia específica y se discuten los cambios citodinámicos que se inducen al analizar los cambios en las citoquinas proinflamatorias evaluadas.

Palabras clave : cucarachas; alergia; anticuerpos IgE; anticuerpos IgG; citoquinas proinflamatorias; inmunoterapia; mejoría sintomática.

“The cockroaches and allergy : 40 years of research.”

Summary : Physicochemical data about several structures of the cockroaches *Periplaneta Americana* and *Blatella germanica* are exposed by the authors who employed the last 40 years (1977-2017) studying their antigenic proteins as well as their sensitizing capacities in human atopic patients specially those suffering allergic rhinitis and asthma. The presence of specific IgE and IgG antibodies were detected before and after the conventional immunotherapeutic schemes to relief the symptoms. Also cytodinamic data were studied analyzing the performance of several pro-inflammatory cytokines released by inflammatory cells during allergic symptoms.

Key words : atopic patients ; rhinitis & asthma ; cockroaches antigens; IgE & IgG antibodies; immunotherapy; pro-inflammatory cytokines.

INTRODUCCION

Interesados por el papel de los ácaros del medio ambiente en la etiopatogenia de la alergia respiratoria (síndrome rinitis/asma), tal como lo documentaron Voorhorst y colaboradores sobre el papel del *Dermatophagoides pteronyssinus*, es que nos abocamos a analizar algunos aspectos fisicoquímicos del ácaro *Dermatophagoides farinae*, único extracto de confiable calidad que pudimos conseguir en aquel momento (1975-1980). Los hallazgos fueron motivo de presentaciones en Jornadas de la especialidad y de publicaciones en revistas científicas.

Para ese entonces, (1977-1984), surge conjuntamente con inquietudes del colega y amigo Julio Félix Albónico, la curiosidad del papel que podría estar jugando un antígeno o antígenos provenientes de otro insecto de mayor tamaño que nos acompaña desde el comienzo de la Humanidad, y, que fuera citado en unos pocos trabajos de la literatura especializada (v.g. Bang y col.), aunque había antecedentes en revistas de agronomía de Colombia de 1964 (v.g. Reyes y col.), sobre la contaminación de alimentos por las cucarachas.

Así comenzó nuestra relación con los blátidos, y, en especial con la *Periplaneta americana* (**Per-a**), que, en un principio mal denominamos *Blattaria sudamericana*, por sugerencia de un colega ya fallecido, y, que un Centro Australiano de Entomología, nos enseñara con los fundamentos de su especialidad la verdadera denominación de la cucaracha que estábamos estudiando.

De esta manera, el colega J.F. Albónico coronó su Tesis Doctoral de 1984, con un merecido sobresaliente, que me enorgullece por haber apadrinado, y que, además uno de los integrantes del Jurado haya sido el eminente Profesor de Tisiología y neumonología y expresidente de la A.M.A., Don Luis Julio González Montaner.

Los hallazgos, que serán largamente expuestos en este trabajo, dieron lugar a que nuestra fantasía nos llevara más allá de los límites de la ciudad de Buenos Aires, y que desde la década de los 90, nos introdujera en el mundo de los reduvídeos, y que el *Triatoma infestans*, alias vinchuca, nos permitiera demostrar que no sólo es el vector de una grave enfermedad que nos sigue preocupando, como lo es el Chagas o *Trypanosomiasis americana*, sino también capaz de inducir anticuerpos IgE en sujetos atópicos de diferentes provincias del país, siendo también responsables esas proteínas heterólogas de cuadros respiratorios crónicos, como aquellos debidos a los ácaros y a las cucarachas.

ENTOMOLOGIA Y SALUD PUBLICA

Las cucarachas pertenecen a uno de los grupos de insectos mejor conocidos y más antiguos, que, tienen la característica de adaptarse a una gran variedad de hábitats. Aparecieron en el periodo cambriano y los fósiles más antiguos datan de 340 millones de años. Son consideradas como un grupo sinantrópico dada la estrecha relación con el hombre, desde que éste habitaba las cavernas.

Actualmente se conocen cerca de 3,500 especies; siendo la mayoría de regiones tropicales. Poseen una gran variedad de formas, tamaños, colores y hábitat en los que subsisten, y sólo unas cuantas representan importancia en salud pública, ya que, se conocen alrededor de 45 patógenos (bacterias, protozoos, helmintos, hongos y virus) que son transmitidos de manera mecánica.

Las cucarachas, presentan formas aplanadas dorso-ventralmente y con tegumento liso, va-

riando en color, desde un café castaño hasta el negro en las especies que invaden las casas. Sus antenas son filiformes y multi-articuladas. Las partes bucales son del tipo mordedor-masticador y el número de alas en general, es de 2 pares, aunque algunas especies presentan sólo vestigios; el par de alas externo es angosto, grueso y coriáceo, mientras que el primer par es de tipo membranoso y se pliega como abanico.

Su ciclo de vida consta de 3 etapas, huevo, ninfa (diversos estadios) y adulto. Los huevos están acomodados en forma pareada, dentro de una cámara llamada ooteca, que tiene forma de frijol y es de estructura coriácea, que puede ser expulsada o bien la hembra puede llevarla hasta la eclosión de las ninfas; en otras especies no hay formación de la ooteca, ya que son ovovivíparas. El número de huevos varía según la especie.

Los estadios inmaduros pueden encontrarse conjuntamente con los adultos; en algunas especies como *Blatella germanica* (**Bla-g**) y *Periplaneta americana* (**Per-a**), una feromona de adherencia es la responsable de la agregación. Son omnívoras pues se alimentan de fuentes que contengan almidón, azúcares, leche, queso, carnes, pasteles, productos de grano, chocolate, dulce, de hecho, ningún comestible que el hombre pueda ingerir está exento de contaminación por estos insectos, que también se alimentan de cubiertas de libros, el forro interior de las suelas, sus propias exuvias, sus parientes muertos o heridos, sangre fresca o seca, excrementos, esputo, uñas de las manos y pies, cadáveres y detritus alimentarios que queden impregnados en los niños, ocasionando en ellos una lesión local denominada "herpes blattae".

Habitualmente regurgitan porciones de su alimento parcialmente digerido y dejan caer heces en donde quiera que estén. Arrojan una secreción nauseabunda por la boca y por las aberturas glandulares del cuerpo, dando un olor persistente y típico, a los alimentos y objetos con los que se contactan.

Son plagas nocturnas ya que caminan y se alimentan por la noche y se esconden en lugares oscuros durante el día. Por ello, las personas no están familiarizadas con sus hábitos alimenticios. En infestaciones altas estos insectos pueden verse durante el día moviéndose por fuera de sus escondites. Migraciones en masa como resultado de la superpoblación, pueden ocurrir en especies como **Bla-g**, **Per-a** y *Blatta orientalis*; en ocasiones ésta recurre al vuelo además de caminar cuando invaden nuevas áreas. Varias especies son transportadas por el hombre de un lugar a otro, en muebles, aparatos domésticos, cajas, entre otros objetos.

Tabla 1.- Descripción de la biología y hábitat de las especies de cucarachas de importancia en salud pública.

Especies	Biología y Hábitat	Descripción y Deposición del huevo
Per-a	Volador débil, prefiere la comida fermentada, se encuentra afuera y dentro de las casas, principalmente en climas calientes. Comúnmente en ciudades con sistema de alcantarillado, dentro de estructuras de desagüe y en área perimetrales.	Color rojizo a café oscuro, 10mm, de largo. Los dejan caer o los pegan en áreas calientes y protegidas, cerca de la comida.

Especies	Biología y Hábitat	Descripción y Deposición del huevo
Periplaneta australasiae	Requieren alta temperatura y humedad, intolerable al frío. Principalmente se alimenta de materiales de plantas, es una plaga de jardín. De lo contrario similar a la cucaracha americana.	Color café oscuro a negro, 12mm, de largo. Con frecuencia lo depositan en grietas y hendiduras.
Periplaneta brunnea	Hábitos similares a la cucaracha americana. Comúnmente se encuentra a fuera de la casa, en áreas calientes y protegidas. En sistemas de alcantarillado, normalmente se alimenta de materiales de plantas, es una plaga de jardín.	Color café oscuro a negro, 12mm, de largo. Los pegan a una superficie adecuada como el concreto y el yeso.
Supella longipalpa	Requieren calor, pero menos humedad que la cucaracha alemana, Se encuentran solamente en el interior de las casas, se refugian por todo el edificio en áreas altas como el techo y marcos de pinturas	Color café rojizo, 5 mm, de largo. Los depositan bajo la superficie de estantes, muebles y grietas.
Blattella germanica	Se encuentra dentro de las casas, en áreas calientes y húmedas. Prefieren las grietas, cerca de la comida y agua, en la cocina o en los baños. Prefieren esconderse en materiales de madera y papel o bien en equipo eléctrico, atracción al calor.	Color café, 6mm de largo, Depositán en áreas protegidas con 1 ó 2 días de incubación.
Blattella orientalis	Prefieren áreas húmedas, temperatura menor de los 29°C, toleran el frío. Comúnmente se encuentran a fuera de las casas, en sótanos, alcantarillado, desagües, alrededor de tuberías, en la pared de terrazas vacías. Prefieren la comida en estado de putrefacción.	Color café rojizo a negro. 10mm, de largo. Los depositan o los pegan en una área protegida y caliente, cerca de la comida.
Parcoblatta pennsylvanica	Se encuentra afuera de las casas, no se reproduce adentro de las casas. Machos voladores, son atraídos por la luz, vuelan hacia las ventanas..	Color café amarillento, 12mm, de largo. Son depositados bajo la corteza de leños caídos, estacas, etc.
Periplaneta fuliginosa	Comúnmente se localizan afuera de las casas, en hoyos de los árboles. Dentro de las casas prefieren el calor, humedad, en lugares huecos dentro de las paredes de los bloques y áticos con muy poca ventilación. Voladores fuertes, Omnívoros.	Color café oscuro a negro, 10mm, de largo. Son depositados o firmemente pegados en la superficie de áreas protegidas.

Los huevos de las cucarachas están alineados verticalmente de 2 en 2 dentro de la ooteca, que están cubiertas por secreciones de las glándulas accesorias; luego será expulsada hacia el exterior. **Blat-g** puede cargar la ooteca durante semanas. En las especies ovovivíparas, la ooteca se retrae hacia la bolsa incubadora, hasta que la progenie eclosiona.

En algunas especies puede ocurrir la partenogénesis. El número de huevos, ootecas y la duración del periodo de incubación varían según la especie.

Patógenos asociados con las cucarachas de importancia en salud pública.

Pocas son las especies de importancia en el área de salud y que invaden las viviendas, como lo son la cucaracha americana, alemana, café, ahumada, oriental y australiana, que representan una plaga de prácticas nocturnas y una alimentación de tipo omnívora, que operan como invasores naturales en las casas; acarreado gérmenes patógenos que logran perdurar viables en sus heces, tubo digestivo e tegumento por varios días o semanas.

Diversas y severas enfermedades del tubo digestivo, se han transmitido de manera experimental, (gastroenteritis) transmitidas por las cucarachas, produciendo náuseas, dolores abdominales, vómitos y diarrea. Los patógenos productores, son transportados en las patas y cuerpos de las cucarachas y son depositados en la comida y diversos utensilios. El excremento y mudas también contienen alérgenos que afectan ojos y piel, y, más seriamente son los principales responsables del asma infantil. Por el momento, no se las relaciona con enfermedades epidémicas.

Agentes patógenos asociados con las especies de cucarachas de importancia en salud pública.

Bacterias		
Patógeno	Enfermedad	Especie de Cucaracha
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Gastroenteritis, infección de heridas, vías urinarias	<i>Per- a</i> <i>Blatta orientalis</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	Conjuntivitis, contaminación de comidas	<i>Per- a</i> <i>B. orientalis</i> <i>Blaberus craniifer</i>
<i>Bacillus cereus</i>	Contaminación de comidas	<i>B. craniifer</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	Enteritis	<i>B. orientalis</i> <i>Per- a</i>
<i>Clostridium perfigrens</i>	Gangrena	Cucarachas en general

<i>Clostridium novii</i>	Gangrena	B. orientalis
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Enterocolitis Bacteriana	Bla- g Per- a
<i>Escherichia coli</i>	Diarrea, Infección de heridas	Bla- g
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Neumonía, Infecciones en vías urinarias	Cucarachas en general
<i>Mycobacterium leprae</i>	Lepra	Bla- g Per- a P. australasiae
<i>Nocardia sp.</i>	Actinomycetoma	Per- a
<i>Proteus morgani</i>	Infección de heridas	Per-a
<i>Proteus rettgeri</i>	Infección de heridas	Per-a
<i>Proteus vulgaris</i>	Infección de heridas	Per-a B. orientalis B. craniifer
<i>Proteus mirabilis</i>	Gastroenteritis, Infección de heridas	Per-a

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gastroenteritis, Infecciones respiratorias	Per-a. B. orientalis Bla- g B. craniifer
<i>Salmonella bredeny</i>	Gastroenteritis, Contaminación de alimentos	Per-a
<i>Salmonella newport</i>	Gastroenteritis, Contaminación de alimentos	Per-a
<i>Salmonella oranienburg</i>	Gastroenteritis, Contaminación de alimentos	Per-a
<i>Salmonella panama</i>	Gastroenteritis, Contaminación de alimentos	Per-a
<i>Salmonella paratyphi-B</i>	Gastroenteritis, Contaminación de alimentos	Per-a
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Neumonía	B. orientalis
<i>Salmonella typhi</i>	Tifoidea	B.orientalis
<i>Salmonella typhimurium</i>	Gastroenteritis, Contaminación de alimentos	Bla- g

		<i>Nauphoeta cinérea</i>
<i>Salmonella riemorbificans</i>	Gastroenteritis, Contaminación de alimentos	<i>Per- a</i>
<i>Salmonella bareilly</i>	Gastroenteritis, Contaminación de alimentos	<i>Per-a</i>
<i>Serratia marscesens</i>	Contaminación de alimentos	<i>Per-a</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>	Disentería	<i>Bla- g</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Infección de heridas, infección de piel, infección de órganos internos	<i>B.orientalis.</i> <i>Bla-g</i> <i>B. craniifer</i>
<i>Streptococcus faecalis</i>	Neumonía	<i>Per-a</i> <i>B. orientalis</i> <i>Bla-g</i>
Vibrio spp.	Infecciones varias.	<i>B. orientalis</i>
<i>Yersinia pestis</i>	Peste bubónica.	<i>B. orientalis</i>

Hongos.

<i>Aspergillus niger</i>	Neumomicosis, otomicosis	<i>Per-a</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Neumomicosis Broncomicosis	<i>B. orientalis</i>
Helmintos		
<i>Ancylostoma duodenale</i>	Parasitosis intestinal.	<i>Per-a</i>
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Parasitosis intestinal.	<i>Per-a</i>
<i>Enterobius vermicularis</i>	Oxiuriasis	<i>B. orientalis</i> <i>Bla-g</i>
<i>Hymenolepis sp</i>	Parasitosis intestinal	<i>Per-a</i>
<i>Necator americano</i>	Parasitosis intestinal	<i>Per-a</i>
<i>Trichuris trichura</i>	Trichuriasis.	<i>Per-a</i> <i>Bla- g</i>
<i>Giardia lamblia</i>	giardiasis	<i>Per-a</i>

<i>Entamoeba histolytica</i>	amebiasis	B. orientalis Bla-g
------------------------------	-----------	--------------------------------------

<i>Trypanosoma cruzi.</i>	Chagas por ingestión de alimentos contaminados	<i>Cucarachas en general</i>
---------------------------	--	------------------------------

Virus

<i>Poliomielitis</i>	Polio	Bla-g
<i>Coxsackie</i>	Miocarditis	Per-a
<i>Hepatitis B</i>	hepatitis	Supella longipalpa

Clasificación taxonómica

En 1969, se publicó el último Catálogo del Mundo de las Cucarachas. Los especialistas en esta temática sostienen que existen entre 3.500 a 4.000 especies de cucarachas, si bien esta cifra cambia constantemente, pues se identifican nuevas especies, entre las que citamos: *Leuropeltis hebaridi*, *Eurycotis alfaroi*, *Eurycotis gurneyi*, *Eurycotis perezassoi*, *Symploce jamaicana* y *Colapteroblatta*, con 12 especies.

De las cucarachas existentes, sólo 35 especies tienen importancia médico-veterinaria, que son:

Superfamilia: Blattoidea.

Familia: Blattidae.

1. *Subfamilia:* Blattinae.
2. *Género:* *Blatta* (Lin).
3. *Especie:* *orientalis* (Lin, 1758).

1. *Superfamilia:* Blattoidea.
2. *Familia:* Blattidae.
3. *Subfamilia:* Blattinae.
4. *Género:* *Periplaneta* (Burmeister).
5. *Especie:* *americana* (Lin, 1758) [Blatta].
brunnea (Burmeister, 1838).
australasiae (Fabricius, 1775).
6. *Superfamilia:* Blaberoidea.
7. *Familia:* Blattellidae.
8. *Subfamilia:* Blattellinae.
9. *Género:* *Blattella*.
10. *Especie:* *germánica* (Lin, 1767) [Blatta].

Las especies de cucarachas domiciliarias más relacionadas con el hombre, y más ampliamente distribuidas son: **Bla-g** (Lin), **Per-a**, (Lin) y *Periplaneta australasiae* (Fab).

Ciclo de vida

Las cucarachas, son insectos de sangre fría y su ciclo de vida varía según la temperatura del medio: a altas temperaturas puede reducirse, y prolongarse a bajas. El nombre de la especie, en modo alguno representa el lugar de procedencia de la misma, ya que indica el lugar donde los taxónomos describieron las especies por primera vez. Un ejemplo es **Bla-g** cuyo origen es Asia contrario a lo que muchos piensan que es de Alemania.

Las cucarachas son insectos hemimetábolos, es decir, tienen una metamorfosis incompleta, y presentan 3 etapas: huevo, ninfa y adulto. La duración del ciclo de vida varía según la especie: en **Bla-g** es de 3 meses y en **Per-a** es de 1 año.

Los huevos se depositan en grupos, incluidos en la ooteca; sus paredes pueden ser más o menos gruesas y su número varía con la especie. Esta puede ser depositada en lugares seguros o transportada externamente en las especies ovíparas, o, incluso, internamente en las vivíparas.

El período de incubación varía con la especie: para **Per-a** de 32 a 53 días, y, para **Bla-g** es de 28 días.

Las ninfas son de vida libre. Por ejemplo, en **Per-a** 13 mudas y en **Bla-g** 6 mudas. En ocasiones no se puede apreciar el número de mudas, pues el insecto tiene el hábito de comerse la exuvia.

El desarrollo ninfal de **Bla-g** puede durar de 30 a 60 días e incluso, 125 días o más en condiciones adversas. Los adultos normalmente viven más de 100 días y bajo condiciones controladas 1 año o más; algunos autores reportan a **Per-a** con un tiempo de vida de 2 a 3 años.

Las cucarachas poseen gran habilidad para sobrevivir en condiciones desfavorables. La ninfa es muy parecida al adulto y varía en el tamaño, pero no tiene desarrolladas las alas ni el aparato genital.

Control biológico.

Importante, aunque poco estudiado, resulta el control biológico de las cucarachas. A él se han dedicado otros autores con pensamientos más ecologistas, que lo ven como el conjunto de métodos más adecuados con vistas a conservar saludable nuestro entorno. Entre las especies analizadas con este objetivo se encuentra el nematodo *Steinernema carpocapsae* y la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis var. kurstaki es de gran utilidad en el control de **Bla-g**. Luego de 20 días de exposición a éste, se obtiene el 100 % de mortalidad de las cucarachas expuestas, lo que demuestra que el compuesto podría ser usado como insecticida no tóxico para los humanos, animales de sangre caliente e insectos útiles.

Al evaluar la infección de **Bla-g** con *Steinernema carpocapsae*, en condiciones de laboratorio, se demostró la efectividad de este método biológico cuando los nematodos atacaron activamente las patas y antenas, y provocaron la muerte a las cucarachas.

Estudios recientes señalan la eficacia del hongo *Metarhizium anisopliae* de la familia Clavi-

cupitaceae, Metchnikoff, sólo o conjuntamente con el ácido bórico, para erradicar totalmente grandes poblaciones de cucarachas de edificios abandonados, bodegas, depósitos, etc.

Control químico.

En su afán por controlar este insecto dañino desde la década del 40 del siglo xx se emplearon con éxito los insecticidas órgano-clorados como el DDT, luego los órgano-fosforados y carbamatos, las piretrinas como agentes “flushing” para el control, y desde los años 80 los insecticidas piretroides y el ácido bórico.

La resistencia a los insecticidas es una dinámica basada en factores dependientes de la bioquímica, fisiología, genética y ecología de los vectores. La proporción de sobrevivientes refleja la presencia del gen o genes que codifican para mecanismos de resistencia (OMS, 1992).

Se reconocen 3 tipos de factores que influyen en la resistencia en las poblaciones de campo: genéticos, biológicos y operacionales. En **Bla-g** se desarrolló más rápido la resistencia que en otras especies de cucaracha, debido a la influencia de los factores biológicos y operacionales. Un amplio número de investigaciones sobre resistencia a insecticidas en diversas zonas geográficas corroboran los datos alarmantes que reporta la OMS en los informes de su Comité de Expertos. Los mecanismos de resistencia desarrollados por esta especie son: detoxificación metabólica incrementada, penetración cuticular disminuida e insensibilidad del sitio blanco.

MATERIALES Y METODOS.

1.- Antígenos :

Extractos de las cucarachas *Periplaneta americana* (**Per-a**) y *Blattella germanica* (**Bla-g**) se prepararon siguiendo las pautas entomológicas establecidas en el Catálogo del Mundo de las Cucarachas (1969), cuyas figuras se exhiben :



Periplaneta americana. (Per-a).

Blattella germanica. (Bla-g).



Se disecaron cuidadosamente las partes exteriores del insecto, en particular, las estructuras quitinosas, haciendo abstinencia del tubo digestivo, que otros autores consideran de importancia en la génesis de respuestas alérgicas (cuerpo entero o whole body).

El intestino de los blátidos es un verdadero campo de cultivo de gérmenes de todo tipo como los mencionados anteriormente, y, por ello, no lo consideramos apto para la preparación de los extractos.

La momificación del insecto adulto, al igual que de sus estadíos ninfales, provee la suficiente cantidad de proteínas estructurales con menor contaminación que el tubo digestivo. Esto, justifica largamente la objeción de algunas costumbres que se han frivolidado en el planeta acerca de los beneficios de comer cucarachas fritas o asadas, al igual que tomar la "leche" hecha con cristales obtenidos del tubo digestivo de estos insectos, por su alto contenido proteico.

Estas patas, alas, antenas, tegmen y cabeza se colocan en solución fisiológica o PBS a pH 7,2, entre 4° y 8° C, para lavar cualquier contaminación del hábitat que lleve el insecto como transportador habitual. Luego de 3 lavados en PBS, todas las estructuras son maceradas hasta constituir un líquido pastoso de color ligeramente marrón para **Per-a** y un poco más oscuro para **Bla-g**.

Ambas suspensiones son pasadas por filtros Millipore de 0,22 μ para su adecuada esterilización y luego (por separado) son guardados a -20°C para su ulterior estudio, cuidadosamente rotulados.

Estos serán los llamados "concentrados" en la jerga del laboratorio inmunológico.

2.- Fraccionamiento por columna de Sephadex G-200 :

3,5 mL del extracto concentrado de **Per-a**, se pasó sin diluir por una columna de Sephadex G-200 de 22 mm por 780 mm, que se equilibró y eluyó con una solución de ClNa-buffer fosfato 0,15 M a pH 8 y a 4°C.

Del fraccionamiento surgieron alícuotas de eluidos de 1 mL al emplear una velocidad de 20 mL/min. Los contenidos proteicos de cada eluido se midieron a 280 nm de densidad óptica en un espectrofotómetro Metrolab mientras que los contenidos de las hexosas se midieron a 470 nm de densidad óptica en el mismo aparato.

La medición cuantitativa de las proteínas se realizó empleando la técnica de Bradford, y la de las hexosas se realizó con el método del indol utilizando una mezcla de galactosa y de manosa como soluciones estándar.

Similar metodología se aplicó cuando se estudió el extracto de **Bla-g**.

3.- Fraccionamiento por columna de intercambio iónico :

5 mL del extracto de **Per-a** se aplicaron a una columna de DEAE-celulosa de 25 mm por 380 mm, luego de haber sido dializados contra buffer fosfato 0,01 M, pH 8.

La elución se hizo con un buffer fosfato 0,01-0,2 M, desde pH 5 hasta pH 8. Los contenidos proteicos y de hexosas se registraron con la misma metodología que se describió en el punto anterior.

El estudio del extracto de **Bla-g** siguió los mismos pasos metodológicos.

4.- Determinación de los pesos moleculares :

diversos marcadores proteicos de pesos moleculares conocidos se emplearon como indicadores estándar. Así, la lisozima (PM.: 14,3 kDa), la beta-lactoglobulina (PM.:18,4 kDa), el tripsinógeno (PM.: 24 kDa), la pepsina (PM.: 34,7 kDa), la albúmina de huevo (PM.: 45 kDa), la albúmina sérica bovina (PM.: 66 kDa), y, la alcohol-dehidrogenasa (PM.: 150 kDa) (Sigma Chemical Co.), fueron sometidos a un pasaje por una columna de Sephadex G-150. Cada proteína tenía una concentración de 13,5 mg en un volumen de 1,5 mL. La columna de 780 mm por 22 mm se equilibró y se eluyó con buffer ClNa 0,15 M-PBS a pH 8 y a 4°C.

Un mililitro de cada sustancia fue colectada y sometida al espectrofotómetro a 280 nm de densidad óptica.

5.- Modelos experimentales en animales : (siguiendo las pautas del CICUAL).

a): Conejos : 10 animales adultos fueron inmunizados con los extractos totales de **Per-a** y de **Bla-g**, separadamente, mediante inyecciones intradérmicas semanales en el dorso de 5 conejos para cada cucaracha.

Cada inoculación estaba compuesta por 0,5 mL de **Per-a** y/o 5 mL de **Bla-g** más 0,5 mL del adyuvante completo de Freund.

Este mililitro de emulsión se repartió en habones de 0,20 mL, y, se administró durante 20 semanas hasta totalizar la incorporación de 1 g. en cada animal.

Diez días después de la última inoculación, los animales fueron sangrados "a blanco" por punción cardíaca bajo anestesia con éter en campana acondicionada para tal fin, y, los sueros obtenidos fueron fraccionados en alícuotas y guardados a -20°C convenientemente rotulados.

De esta forma, se obtuvieron 2 antisueros de conejo, **anti-Per-a** y **anti-Bla-g**, para emplear en diversas pruebas inmunológicas, y, como elementos probatorios de la potente antigenicidad de los antígenos de las cucarachas.

b): Cobayos : 20 animales adultos de 250-300 g de peso y libres de enfermedad evidente y de experiencias previas, recibieron durante 10 semanas (70 días) una cantidad diaria de 8 mg de los extractos de **Per-a** y de **Bla-g** (10 cobayos para cada uno de ellos) disueltos en 10 mL de PBS, que se administraron de la siguiente manera : un grupo de 5 animales se colocó en una campana de vidrio con un volumen de 6000 cm³ conectada con un nebulizador ultrasónico que aerosolizó los 10 mL en un lapso de una hora produciendo partículas de 3 μ . Este procedimiento se repitió tantas veces como fue necesario para aerosolizar a todos los cobayos del grupo experimental tanto con **Per-a** como con **Bla-g**.

Por otro lado, 5 cobayos de igual edad y peso, que constituyeron el grupo control recibieron idéntico tratamiento, pero fueron aerosolizados con 10 mL de PBS, en otra campana de vidrio de igual volumen, pero que no había sido utilizada en ningún experimento previo. Semanalmente, una hora después de la aerosolización, un cobayo del grupo experimental, tanto con **Per-a** como con **Bla-g**, fue sacrificado bajo anestesia con éter, su sangre recogida, y muestras de sus órganos (bazo, hígado, riñón y pulmón) fueron extraídas y fijadas en líquido de Bouin, para los estudios histopatológicos ulteriores.

En el caso del grupo control, se esperaron las 10 semanas para la obtención de la sangre y de los órganos, con el propósito de valorar si la prolongación del experimento y la reiteración de las aerosolizaciones con un material inocuo, podría inducir algún cambio en la serología e histopatología de los cobayos que pudiera ser atribuída erróneamente a los antígenos de las cucarachas.

Los antisueros de cobayo **anti-Per-a** y **anti-Bla-g** se guardaron separadamente a -20°C para ulteriores evaluaciones inmunológicas, así como, los sueros de los cobayos no-aerosolizados que sirvieron de control.

Los tejidos fijados (alcohol-xilol), parafinados, cortados (6 μ) y coloreados con hematoxilina-eosina, PAS y azul de toluidina 1%, se destinaron a documentar la histopatología –especialmente pulmonar- de la aerosolización con antígenos de las cucarachas **Per-a** y **Bla-g**.

Los signos objetivos de neumonitis por hipersensibilidad a nivel histopatológico se basaron en el hallazgo de : bronquiolitis celular, infiltrados intersticiales y granulomas no-caseosos. Estos hallazgos agregados a las células gigantes multinucleadas, a las células espumosas intraalveolares, a la neumonía organizada, a la bronquiolitis obliterans y a la fibrosis intersticial, fueron estratificados en 5 grupos.

Así, el **grupo I** comprende bronquiolitis celular con linfocitos y plasmocitos infiltrando los bronquiolos sin afectación de los sacos alveolares; el epitelio bronquiolar permanece intacto y la luz tubular tiene muy escaso exudado.

El **grupo II** expone infiltrados intersticiales más ricos en linfocitos y plasmocitos que también involucran a las paredes alveolares.

El **grupo III** revela la aparición de granulomas solitarios no caseosos distribuidos al azar en el parénquima, en las paredes bronquiolares y en las alveolares sin afectación de las paredes vasculares.

El **grupo IV** muestra la presencia de histiocitos epitelioides que se agrupan e imitan a los granulomas en los alveólos con o sin el acompañamiento de células gigantes. Estas, solitarias o en grupos, tienen inclusiones de colesterol, cuerpos asteroides y los de Schaumann.

El **grupo V** de mayor deterioro, presenta neumonía organizada, bronquitis obliterante y fibrosis intersticial.

Las microfotografías se tomaron con un microscopio Unic a 100X, 400X y 1000X con una película Agfa-Color de 21° Din (100 ASA).

6.- Técnicas inmunológicas :

los antisueros **anti-Per-a** y **anti-Bla-g** fueron testificados contra sus respectivos antígenos y también en pruebas cruzadas para valorar la presencia de epitopes antigénicos comunes a las 2 especies de las cucarachas.

Se emplearon la doble difusión en agar de Ouchterlony, la hemaglutinación pasiva de Boyden, la contra-inmuno-electroforesis y la rocket-electroforesis. Idénticos pasos se aplicaron con los sueros de los cobayos aerosolizados, tanto experimentales como controles.

El test de Ovary-Bier o de la anafilaxia cutánea pasiva para detectar la existencia de anticuerpos citofílicos (IgE o IgG1), en los cobayos aerosolizados, se realizó con cobayos vírgenes de 250-300 g que se inyectaron en la piel rasurada del dorso con 0,10 mL de cada antisuero sin diluir en una disposición parasagital en el hemidorso izquierdo mientras que en el hemidorso derecho se inyectaron habones de igual volumen de suero normal de cobayo (o de conejo según la experiencia) sin diluir.

A las 24 hs, estos cobayos fueron inyectados por la vena safena de la pata posterior, previamente disecada con cuidado, con una mezcla de 0,5 mL de antígeno (**Per-a** o **Bla-g**) más 0,5 mL de un colorante (Azul de Evans 1% en PBS).

Después de 30 min cada cobayo fue anestesiado con éter sulfúrico en una campana dispuesta para tal fin, y, una vez muerto, fue disecada la piel del dorso, y valoradas por la cara interna la presencia o no de manchas azules consecutivas a la extravasación del colorante indicador en la dermis.

Indirectamente, estas manchas azules son indicadoras de una reacción antígeno-anticuerpo inductoras de vasodilatación capilar intensa (fenómeno anafiláctico localizado) y, por lo tanto, de positividad reactiva.

Esta técnica no discrimina entre las IgE o IgG1, pero ratifica la citofilia del anticuerpo como

propiedad biológica sobresaliente. Las pieles son fotografiadas de manera convencional para su documentación.

7.- Prueba de la desgranulación de los basófilos :

esta técnica se desarrolló siguiendo los pasos aconsejados por Benveniste y la lectura por Feliú. Sin embargo, para brindar más estabilidad a las células procesadas, se introdujeron algunas modificaciones.

Así, en lugar del EDTA-bifosfato se empleó a EDTA-trifosfato, y, en cambio de la solución Tris-Tyrode se usó un buffer de PBS-Ca⁺⁺-Mg⁺⁺.

Los basófilos se fijaron con metanol en lugar de ser secados con aire caliente y se colorearon con azul de toluidina 0,025%. Las células se obtuvieron de la sangre de los cobayos aerosolizados, de los pacientes estudiados con rinitis/asma e hipersensibilidad documentada a los antígenos de cucarachas, y del grupo control.

8.- Isoelectroenfoque :

se realizó en capas delgadas de gel de agarosa con un rango de pH 4,0 – 6,5 siguiendo las especificaciones para el tiempo de corrida e intensidad de la corriente del fabricante (Bio-Rad). Un grupo estándar de marcadores proteicos con pH entre 3,5 – 9,5 se utilizó como monitor del gradiente de pH. El pH de cada banda individual fue determinado a punto de partida de la curva de calibración de las proteínas estándar. Luego de completada la corrida, la mitad del gel fue removida, fijada durante una hora, y coloreada durante 20 min en azul de Coomassie R-250 al 0,1%, inicialmente calentado a 60°C.

9.- Electroforesis capilar :

esta técnica analítica de gran capacidad resolutive para el estudio de las glicoproteínas antigénicas de los insectos fue desarrollada por uno de nuestros colaboradores en los laboratorios de Bio-Rad (Hércules, California, EEUU).

Se llevó a cabo con un sistema Bio-Focus 3000, siguiendo estrictamente las especificaciones del laboratorio en lo relativo a tiempo de corrida y potencia eléctrica.

Se corrieron separadamente antígenos de la **Per-a**, de la **Bla-g**, de las mudas o estadios ninfales y del adulto. Por fin, se valoró la superposición de imágenes o trazados de los antígenos.

10.- Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):

minigeles de 10 x 10 cm cada uno y de 1,5 mm de espesor compuestos por acrilamida al 12% (según Laemmli), con el agregado de gelatina a una concentración final del 0,2%. Las corridas se hicieron a 130 V durante 2 horas.

Cuando se empleó el azul de bromofenol como marcador que alcanzó el tope, la corrida fue detenida y los geles lavados 2 veces en agua destilada con Tritón-X-100, al 0,15% por 15 minutos y luego incubados a 37°C en 0,1% de 2-[N-morfolino]etano-ácido sulfónico (MES) bufferado a pH 6, en Tris-AcH 100 mM a pH 3,5 y en Tris-ClH 100 mM a pH 8,5 conteniendo 0,5 mM diethiltireitol (DTT).

La reacción se detuvo y las proteínas fueron coloreadas por incubación a temperatura ambiente con 0,25 mL de azul brillante de Coomassie R-250 en metanol-ácido acético-agua 5:1:5 (v/v/v). Después de la decoloración con metanol al 20% y ácido acético al 10% las bandas activas se observaron como decoloradas sobre un fondo azul.

11.- Ensayos inhibitorios:

el lavado y la incubación de los geles se realizó con y sin inhibidores de las proteasas. Las soluciones empleadas fueron: el E-64 (L-trans-epoxi-succinil-leucilamido [4-guanidino]-butano en 20 μ M; el TLC (tosil-lisil-cloro-metilcetona) en 100 μ M; el TPCK (tosil-fenil-alanil-cloro-metilcetona) en 1 mM; el PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoruro) en 10 mM; la leupeptina en 100 mM; la o-fenantrolina 1 mM y la pepstatina-A en 2 μ M.

Los pesos moleculares de los marcadores proteicos utilizados fueron: fosforilasa-b (97,4 kDa), albúmina sérica bovina (66,2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de la tripsina (21,5 kDa) y lisozima (14,4 kDa).

Para los geles activados, las muestras no fueron ni reducidas ni calentadas antes de la siembra.

12.- Western-blot :

las muestras con y sin β -mercaptoetanol y calentamiento fueron corridas en SDS-PAGE con el 15% de poliacrilamida estándar, electro-transferidas a membranas de nitrocelulosa, bloqueadas durante 2 hs con una solución conteniendo albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos al 2%, Tween-20 al 0,01 % en PBS pH 7,2 v/v y luego incubadas durante toda la noche con un suero de conejo policlonal **anti-Per-a** 1/400 y un suero humano **anti-Per-a** 1/5.

Luego de la incubación durante toda la noche, las membranas fueron lavadas repetidamente, y luego, incubadas con un suero de cabra anti-IgG 1/3000 de conejo conjugado con peroxidasa y con un 1/500 de suero de conejo anti-IgE específica para cadenas épsilon conjugado con peroxidasa durante 2 hs a temperatura ambiente.

La detección colorimétrica fue realizada con α -cloronaftol y peróxido de hidrógeno.

13.- Radioinmunoensayos :

la IgE sérica humana se midió por el método del PRIST (Phadebas, Pharmacia, Uppsala, Suecia) siguiendo estrictamente las recomendaciones del fabricante. Los valores se expresaron en KU/L (kilo unidades por litro).

Los valores para los adultos normales de nuestra población son inferiores a **120 KU/L**, no obstante, la clínica es soberana (ciertas parasitosis intestinales elevan los valores de la IgE en sujetos no atópicos al igual que en los atópicos).

Por su parte, la IgE específica (sérica) para un alérgeno determinado se determinó mediante el RAST (radio-alergo-sorbent-test). Se realizó con los antígenos de la **Per-a** y de la **Bla-g**, que constituyeron la fase sólida (13 mg/mL de proteínas) unidos covalentemente a los discos de celulosa (SS547) bajo tratamiento con bromuro de cianógeno a pH 11 durante 2 hs en un medio alcalino.

Se midió en **PRU/mL** (Phadebas RAST Units) de acuerdo a la siguiente escala :

menos de 0,35 PRU/mL , sin significación;

entre 0,35-0,70 PRU/mL , con significación, es decir, presencia de IgE específica, que corresponde a la antigua denominación de clase 1;

entre 0,70-3,50 PRU/mL, corresponde a la clase 2;

entre 3,50-17 , antes la clase 3;

entre 17-35 , antes la clase 4;

entre 35-50 , antes la clase 5 y

entre 50-100, antes la clase 6.

La *inhibición* del RAST es una técnica que se utiliza para establecer la especificidad del RAST contra un alérgeno determinado. Se basa en absorber el anticuerpo que se investiga con dosis crecientes del alérgeno que se conoce, *in vitro*, y volver a realizar la técnica del RAST con las nuevas muestras del antisuero.

También se utilizan otros antígenos no relacionados con el conocido, en nuestro caso de la **Per-a**, usamos pólenes de Ambrosia, de gramíneas, y escamas de gato que no poseen relación con la **Per-a**, con los cuales se intenta anular a los anticuerpos IgE específicos contra la **Per-a**.

Se lee y se transporta a un gráfico donde la abscisa registra la concentración antigénica y la ordenada el porcentaje de inhibición.

14.- Pacientes :

como grupo *experimental*, 172 varones y 68 mujeres, con edades comprendidas entre los 22 y los 44 años, que sufrían cuadros respiratorios compatibles con una rinitis perenne y asma bronquial desde niños, con antecedentes familiares de enfermedad respiratoria crónica, que sólo aliviaba con medicación en aerosol nasal y/o bronquial, antihistamínicos con o sin beta-adrenérgicos, y que nunca recibieron vacunoterapia específica por razones sociales, económicas o profesionales. Todos estos pacientes señalaron que en sus respectivos domicilios habían detectado la presencia de cucarachas de mediano y gran tamaño, y, que trataron siempre de combatir las con diversos métodos químicos y naturales.

Por otro lado, como grupo *control*, 50 personas, 37 varones y 13 mujeres, con edades entre los 25 y 53 años, que habían consultado por intolerancias medicamentosas, no encuadradas en reacciones alérgicas propiamente dichas, o solicitando esquemas de protección ante la utilización de medios de contraste yodado, sin antecedentes familiares de enfermedad alérgica, contribuyeron en colaborar al aceptar la testificación con los antígenos en estudio y brindar una cuota de sangre venosa. Todos los pacientes estuvieron de acuerdo en aceptar el consentimiento informado según la fórmula de Helsinki.

15.- Pruebas cutáneas de hipersensibilidad inmediata :

los extractos de **Per-a** y de **Bla-g** y sus fracciones solubles se esterilizaron por filtros Millipore (0,22 μ m). Cada paciente recibió por la vía intradérmica en el brazo (cara externa), 0,025 mL de **Per-a** y de **Bla-g** 1/100, y de los picos proteicos obtenidos por Sephadex G-150 y por DEAE-celulosa.

Además se emplearon alérgenos comunes del hábitat que integran el estudio habitual del paciente alérgico-respiratorio.

Como controles se utilizaron habones de igual volumen de solución fisiológica estéril pH 7,2 e histamina 1/1000. Se leyeron a los 20 min, y se valoró la producción del eritema y la pápula en comparación con el habón histamínico que había alcanzado su máximo nivel reaccional.

Se documentó dentro de los siguientes valores : 0 = sin reacción; 1+ : entre 1-4 mm;

2+ : entre 5-9 mm; 3+ : 10-14 mm; 4+ : > 15 mm.

Las pruebas siempre se realizaron por la mañana, y, por la misma persona. En el momento de las pruebas, y desde 7 días antes, ninguno de los sujetos estaba ingiriendo antihistamínicos, β -agonistas, corticoides por vía general o inhalatoria, cromoglicato, ketotifeno, montelukast o antidepresivos.

16.- Inmunoterapia específica con Per-a y con Bla-g :

se realizó semanalmente por vía subcutánea en el brazo, con un volumen inicial de 0.05 mL hasta 0.50 mL, de una solución de **Per-a**, y de **Bla-g**, desde 1.67 mcg/proteína de cada una de ellas –por separado en grupos distintos- hasta 1.5 mg/proteína, al cabo de los 5 años. Luego de cada inyección, el paciente permaneció 30 minutos en el consultorio, para controlar cualquier reacción adversa .

17.- Determinación sérica de las IL-2, IL-4 e IL-4R :

Todas las muestras séricas se guardaron a -20° C.

Las IL-2 e IL-4 se determinaron por ELISA , mientras que el IL-4R fue detectado con un anti-CD124 de conejo, producido por nosotros, unido al I¹³¹ (Ceska y Erikson).

18.- Evaluación clínica :

los síntomas de rinitis alérgica se valoraron antes y después de cada año de IT siguiendo los criterios de Okuda (planillas de registro diario de los síntomas y signos).

RESULTADOS.

El fraccionamiento por columna de Sephadex G-200 de los extractos de **Per-a** y de **Bla-g**, mostró *proteínas* entre los tubos 83-113 y por DEAE-celulosa entre 190-290; las *hexosas* ocuparon los tubos 12, 64, 84 y 112, en la primera, y los tubos 70, 100, 130, 150, 170 y 250, en la segunda. El Bradford detectó 42 mg/mL de proteínas en **Per-a** y de 2000 mcg/mL de hexosas. La correspondencia entre **Per-a** y **Bla-g**, fue similar, no obstante, la cantidad de proteínas en **Bla-g** fue menor (33 mg/mL) al igual que la de las hexosas (1200 mcg/mL). Estos datos abogan por la composición glucoproteica de **Per-a** y de **Bla-g**, que, como inmunógenos produjeron anticuerpos específicos en conejos revelados por el Ouchterlony, el Boyden y la inmuno-electroforesis, con bandas de precipitación e identidad entre **Per-a** y **Bla-g**, y títulos de 1/1024 en el Boyden y bandas de precipitación contra **Per-a** en una reacción cruzada, lo que sugiere epitopes comunes entre los extractos. Las absorciones de los sueros de conejo **anti-Per-a** y **anti-Bla-g**, realizadas con **Per-a** y **Bla-g**, en forma directa y cruzada, corroboraron la presencia de antígenos comunes, siendo más notorias las de la **Per-a** con la **Bla-g**, que las de la **Bla-g** con la **Per-a**, posiblemente, por mayor riqueza proteica y antigénica, y por razones fisicoquímicas de interferencia inespecífica.

Fig. 1 : Pasaje del extracto de **Per-a** por columna de Sephadex G-200. Se observa un gran pico proteico entre los tubos 83 y 113.

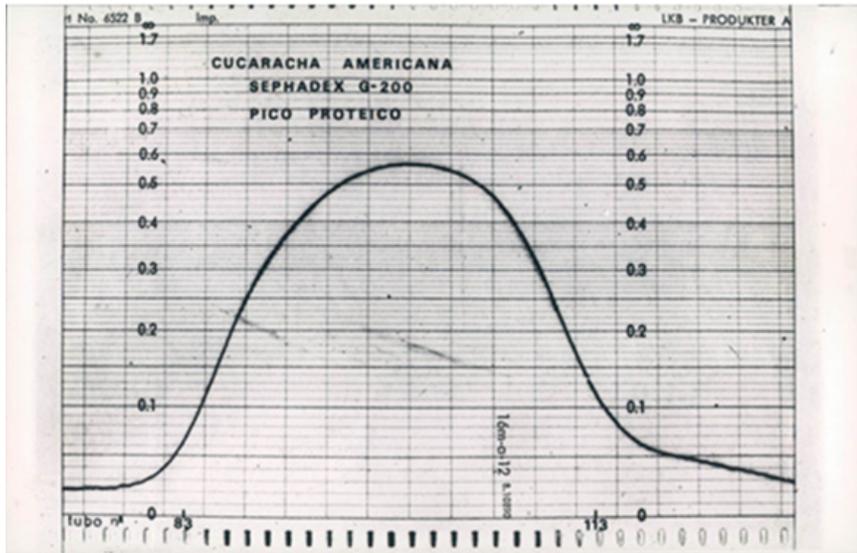


Fig. 2 : Pasaje del extracto de **Per-a** por columna de DEAE-celulosa. Se observa un gran pico proteico entre los tubos 190 y 290.

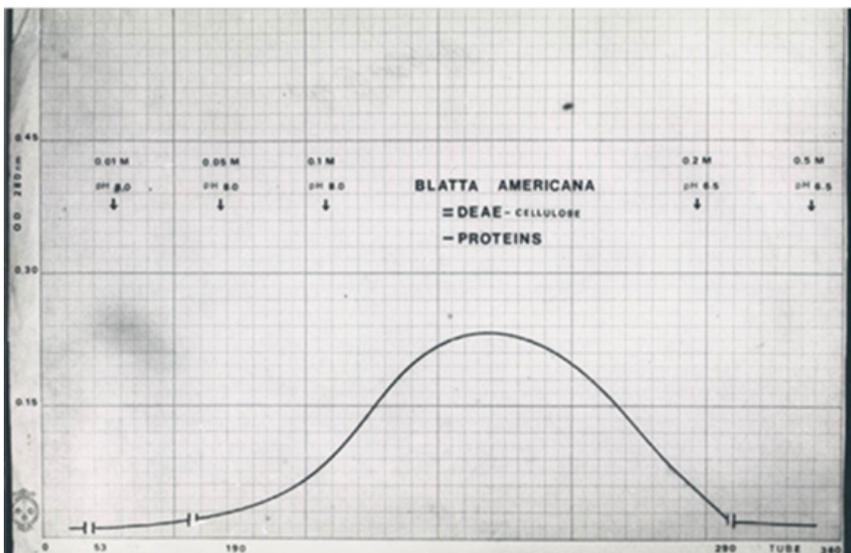


Fig. 3 : Picos de hexosas por pasaje por Sephadex G-200.
Se observan 4 picos importantes en los tubos 12, 64, 84 y 112.

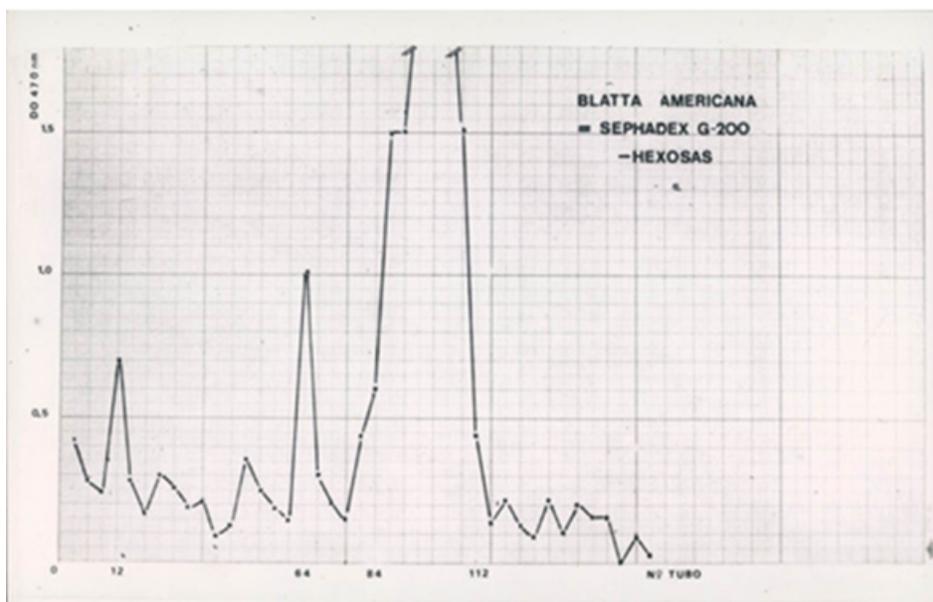


Fig. 4 : Pasaje del extracto de *Per-a* por columna de DEAE-celulosa.
Se obtienen varios picos de hexosas en los tubos 70, 100, 130, 150, 170 y 250.

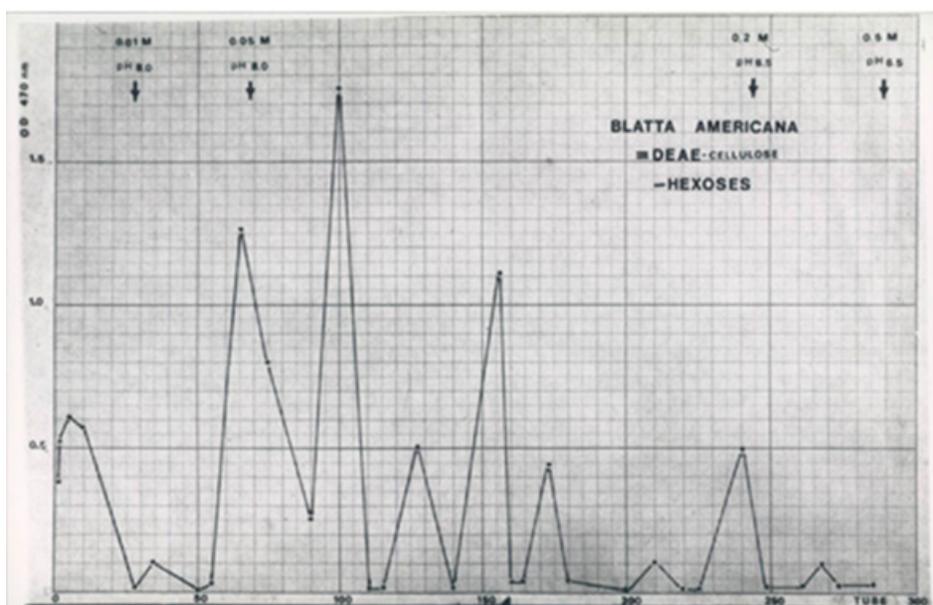


Fig. 5 : Test de doble difusión en agar de Ouchterlony.

Se observan bandas de precipitación entre los extractos de **Per-a** (P) y de **Bla-g** (G) frente a un antisuero de conejo **anti-Per-a** (S) con bandas con identidad total y parcial, por epítopes comunes a **Per-a** y a **Bla-g**.

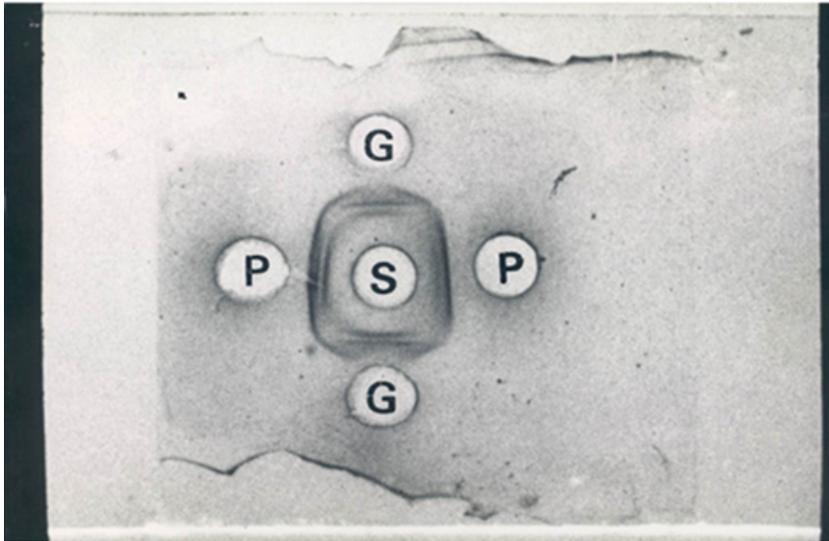


Fig. 6 : Gráfico en escala semilogarítmica de los pesos moleculares de los marcadores proteicos conocidos y del extracto de **Per-a**, que se indica con una B.

El peso molecular estimado para la **Per-a** sería aproximado a los 180 kDa, y , para la **Bla-g** de 110 kDa.

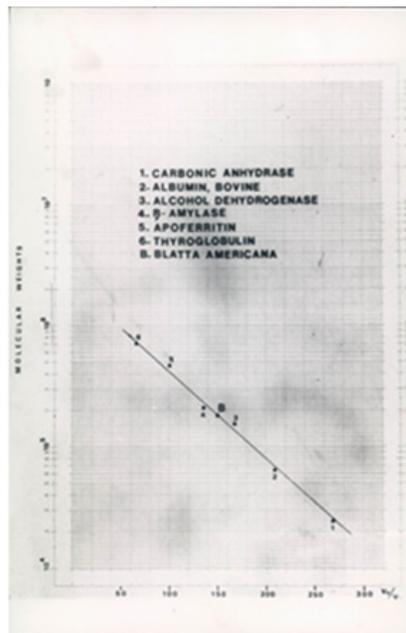
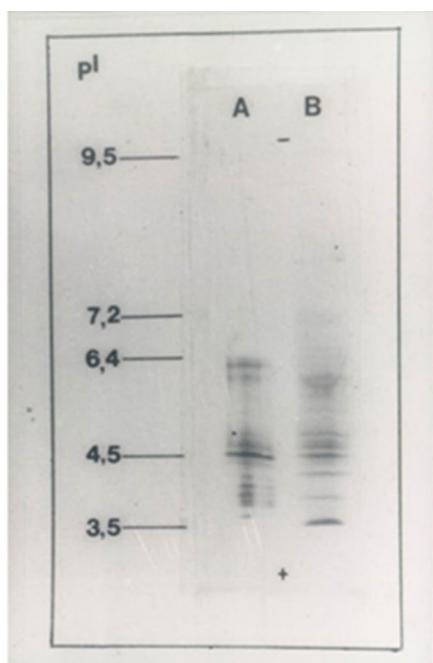


Fig. 7 : Determinación del pI (punto isoeléctrico) entre las proteínas de los extractos de **Per-a** (A) y de **Bla-g** (B), donde se observan a pI 4,5 varias bandas comunes.



La contra-inmuno-electroforesis y la rocket-electroforesis también revelaron bandas de precipitación en los sistemas **Per-a-anti-Per-a**, **Bla-g-anti-Bla-g**, y en las cruzadas, **Per-a-anti-Bla-g** y **Bla-g-anti-Per-a**.

La existencia de epitopes comunes entre ambas especies, y, quizás por extensión entre las especies de cucarachas más comunes en el hábitat, podría ser un rasgo común de las especies, y, por ello la connotación clínica en los enfermos atópicos ser de gran importancia en la génesis de su padecimiento respiratorio.

Análoga conclusión expresamos en su momento con relación a los antígenos del *Triatoma infestans* (vinchuca) cuando demostramos su destacada reactividad cruzada con algunos péptidos de las cucarachas **Per-a** y **Bla-g**.

Fig. 8 : Se observan bandas coincidentes entre la **Per-a** y el *Triatoma infestans* que corresponden a antígenos comunes a las 2 especies.

Electroforesis en gel de poliacrilamida de extractos de *Triatoma infestans* (Ti) y *Periplaneta americana* (Pa)

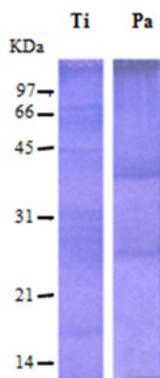
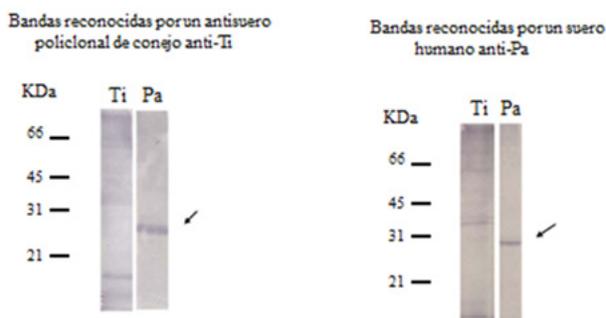


Fig. 9 : Se exponen los resultados que demuestran la reactividad cruzada entre los extractos de **Per-a** y de *Triatoma infestans* tanto frente a un suero experimental de conejo como frente a un suero humano **anti-Per-a**. Similares resultados se obtuvieron con un suero humano **anti-Bla-g**.

Ensayos de reactividad cruzada entre los extractos de *Triatoma infestans* (Ti) y *Periplaneta americana* (Pa)



La inmuno-transferencia conjuntamente con el isoelectroenfoque reveló, por lo menos, 11 diferentes bandas de proteínas (antígenos potenciales); al incubar con los anticuerpos marcados con radioisótopos (I^{125}) se detectó una unión positiva a 3 proteínas. Estas podrían ser coincidentes con aquellas fracciones solubles obtenidas por Sephadex G-200, o sean, los tubos 83-113 y 190-290 de DEAE-celulosa. Los patrones coincidentes esta-

rían a un pI de 4,5 – 5,0.

La actividad gelatinolítica de las **Per-a** y **Bla-g**, en el SDS-PAGE, con gelatina copolimerizada como sustrato fue marcada a 56 kDa. El patrón de la actividad proteolítica de la **Per-a** y de la **Bla-g**, fue analizado a 3 diferentes pHs, 4,5; 6,5 y 8,5.

La mayor actividad enzimática de **Bla-g** se halló a pH 8,5 mientras que la de **Per-a** fue a pH 6,5 con menor actividad a los otros pH testificados. Este patrón de actividad a pH 8,5 fue altamente sensible al PMSF sugiriendo que, posiblemente, podría tratarse de un serina-proteasa. Por otro lado, un suero humano anti-Per-a reconoció bandas de 32 y 24 kDa, y, otro anti-Bla-g, bandas de 34 kDa.

En lo relativo a las testificaciones cutáneas, los pacientes atópicos revelaron pruebas positivas a los alérgenos de **Per-a** y de **Bla-g**, mientras que fueron más reactivas las fracciones 83-113 del Sephadex G-200 que las 190-290 del DEAE-celulosa.

Por su parte, el ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*, y los hongos anemófilos *Alternaria alternata*, *Penicillium notatum*, *Rhizopus nigricans*, *Bipolaris australiensis*, *Dreschlera* sp., también revelaron reactividad cutánea > 5 mm en las testificaciones rutinarias lo cual ratificaba su condición de atópico.

Los métodos radio-inmunológicos revelaron valores – PRIST- para los sujetos del grupo control entre 22 y 71 KU/L para la IgE sérica total, mientras que el mismo grupo de personas resultó totalmente negativo para antígenos de las cucarachas **Per-a** y **Bla-g** en el RAST, buscando anticuerpos IgE-específicos **anti-Per-a** y **anti-Bla-g**.

La IgE sérica total –PRIST- para los pacientes atópicos se halló entre los 125 y 1410 KU/L, lo que aseguró su marcador de atopía, con un promedio de 720 ± 205 KU/L.

La IgE-RAST-específica fue positiva para **Per-a** y **Bla-g** en 42 con clase 1 (0,35-0,70 PRU/mL), en 153 con clase 2 (0,70-3,50 PRU/mL), en 38 con clase 3 (3,50-17 PRU/mL) y en 7 con clase 4 (17-50 PRU/mL).

El RAST-inhibición probó fehacientemente la especificidad de los anticuerpos **anti-Per-a** y **anti-Bla-g**, lográndose el máximo de inhibición cercana al 100% mientras que las absorciones con otros antígenos (Ambrosia, gramíneas y epitelio de gato), no fueron capaces de bloquear la reactividad de dichos anticuerpos específicos y, por ende, su porcentaje de inhibición fue despreciable entre un 8 y 15% inducido exclusivamente por fenómenos fisicoquímicos inespecíficos.

La inhibición de los **anti-Per-a** y **anti-Bla-g**, fue dependiente de las dosis del antígeno empleadas en las sucesivas incubaciones. De tal manera, con cantidades de 10^{-6} y de 10^{-5} del antígeno, la inhibición fue mínima mientras que con 10^{-4} y 10^{-3} , la curva sigmoidea se dibuja alcanzando su meseta entre 10^{-2} y 10^{-1} .

La electroforesis capilar demostró gráficas similares para la **Per-a**, **Bla-g** y sus estadios ninfales, las que al superponerse casi eran coincidentes, lo cual ratifica la existencia de epitopes comunes –aunque no necesariamente iguales- entre los extractos de **Per-a** y de **Bla-g**, y las ninfas respectivas, aunque en estas podrían expresarse epitopes tempranamente que se anularían en los especímenes adultos o bien podrían sufrir transformaciones bioquímicas o

estructurales que sólo se hallarían en los adultos.

De todas maneras, estas moléculas conservarían la antigenicidad propia de la especie y serían alergizantes para los atópicos.

La histopatología de los cobayos aerosolizados con PBS que actuaron como controles de la experiencia, no mostraron ninguna alteración a nivel de sus pulmones, riñones, bazo e hígado, a todo lo largo de las 10 semanas de aerosolización. Conservaban su peso original, no mostraban signos evidentes de disnea ni habían perdido el apetito.

Por otro lado, los cobayos del grupo experimental que recibieron en su aerosol la **Per-a** y la **Bla-g** (separadamente), mostraban signos macroscópicos de sufrimiento respiratorio, ligera pérdida de peso y cierta renuencia a alimentarse.

El estudio microscópico de sus pulmones reveló que durante las 2 primeras semanas, sólo se detectaron exudados erráticos en la luz bronquial y bronquiolar con un epitelio intacto.

Durante las 3ª y 4ª semanas, la riqueza celular de los bronquiolos se incrementó con cordones de linfocitos y plasmocitos que constituyeron una bronquiolitis.

En las semanas 5ª, 6ª y 7ª, el infiltrado intersticial aumentó notablemente con engrosamiento de las paredes alveolares.

En las 3 últimas semanas, aparecieron los granulomas no caseosos, con distribución errática en todo el parénquima pulmonar, y, en muchos alvéolos se observaron células gigantes, células espumosas (foamy) e histiocitos epitelioides.

El azul de toluidina no reveló la presencia de células metacromáticas (mastocitos) tanto en los controles como en los experimentales.

El PAS reveló engrosamiento de las membranas basales pulmonares y renales, destacándose en pocos casos, fenestraciones de dichas membranas en los alvéolos pulmonares.

Por su parte, los resultados de la *inmunoterapia específica (IT)*, se consignan al final del trabajo en 5 tablas ad-hoc, en las cuales se resumen los hallazgos de los vacunados y de los no-vacunados (controles) en 2 grupos de 7 y de 5 pacientes, respectivamente, habida cuenta que tabular 240 experimentales y 50 controles, hubiera sido muy gravoso para el lector, y son representativos del total de los pacientes estudiados.

Fig. 10 : SDS-PAGE de izquierda a derecha : ooteca **Bla-g**, ooteca **Per-a**, ninfa de **Bla-g**, adulto de **Bla-g**, marcadores proteicos, adulto **Per-a** y ninfa **Per-a**. (izquierda a derecha).

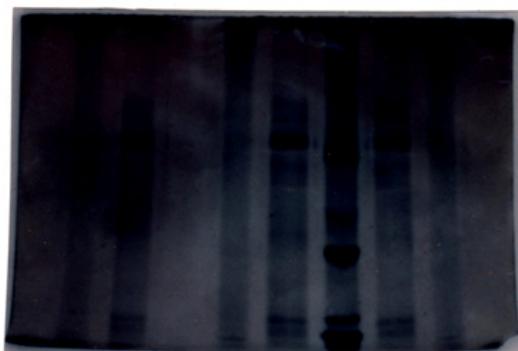


Fig. 11 : Patrones gelatinolíticos de **Per-a** y de **Bla-g**.

A : los canales 1, 2 y 3 corresponden a 1,15 , 2,30 y 4,60 mcg de proteína pura de **Bla-g** ;

B : los canales 4, 5 y 6 corresponden a 1,15 , 2,30 y 4,60 mcg de proteína pura de **Per-a**.

Las manchas blancas indican la lisis de la gelatina del SDS-PAGE entre 45 y 66 kDa para **Bla-g** y de 24 a 90 kDa para **Per-a**.

(Los números indican los pesos moleculares de los marcadores proteicos de control).

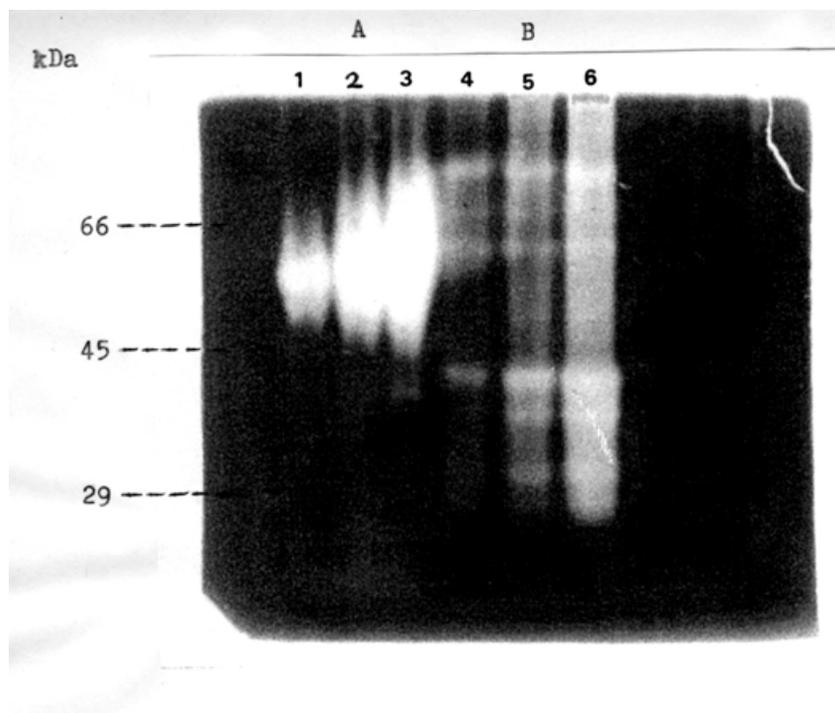


Fig. 12 : Efecto del TCLK a pH 6 sobre las diversas proteasas de la *Per-a*. Se observa la escasa inhibición a 43,6 kDa.

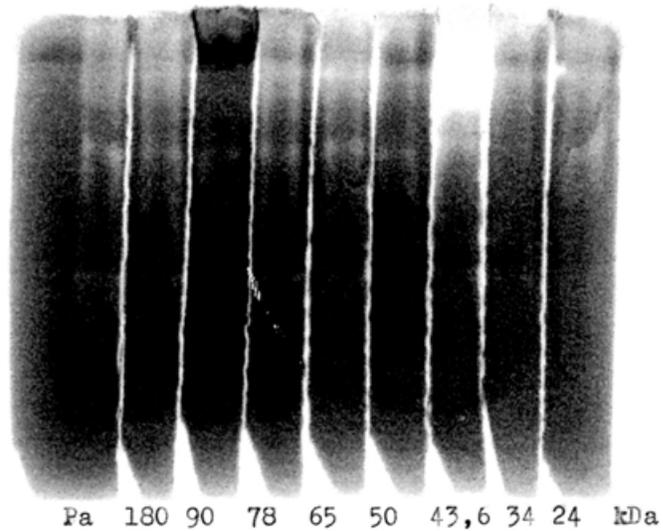


Fig. 13 : Actividad gelatinolítica de la *Per-a* a diferentes pHs.
1.- pH 3,5 2.- pH 6 3.- pH 8,5
La mayor actividad se observa a pH 8,5.

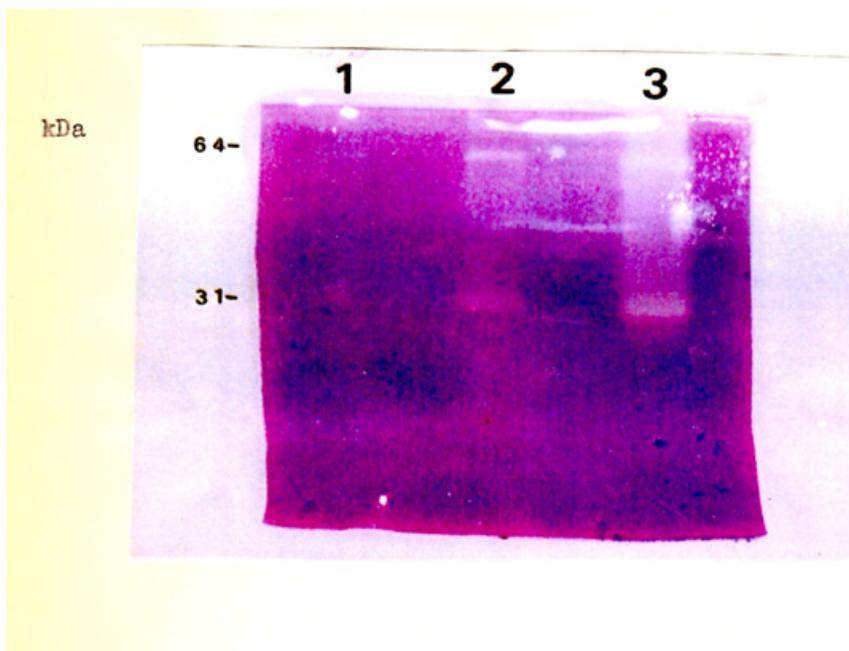


Fig. 14 : Inhibición de la actividad gelatinolítica de la **Per-a**.

1 : control sin inhibición.

2 : inhibición con el PMSF.

3 : inhibición con el TLCK.

Se observa total inhibición con el TLCK.

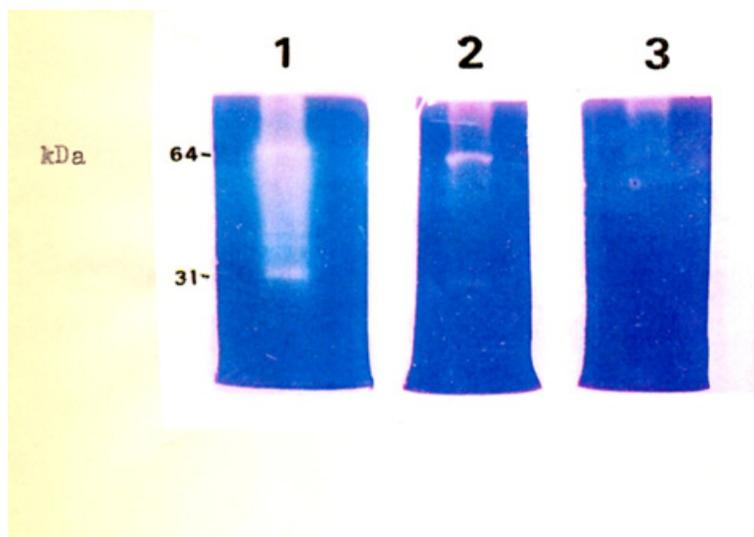


Fig. 15 : Western-blots con sueros **anti-Per-a** y **anti-Bla-g**.

1.- Incubación con suero de conejo **anti-Per-a** más anti-IgG como segundo anticuerpo.

2.- Incubación con suero humano **anti-Per-a** más anti-IgE-

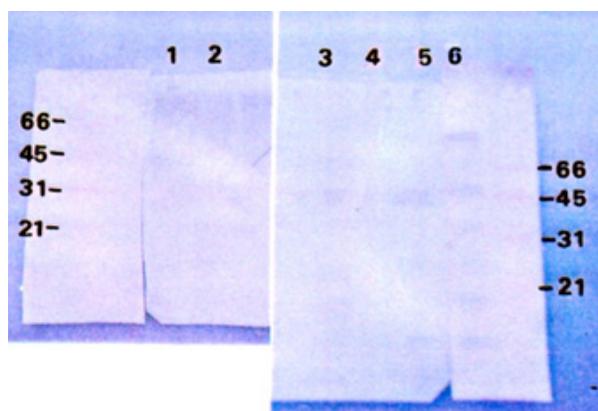
3 y 4.- Incubaciones con suero de conejo **anti-Per-a** más anti-IgG.

5 y 6.- Incubaciones con suero humano **anti-Bla-g** más anti-IgE.

En 1 y 2, se empleó **Per-a**. Se produjo conjugación de los reactantes.

En 3, 4 y 5, se empleó **Bla-g**. Si bien hay reacción, ésta es más notoria en 5 y 6.

En 2 y 6, se observan bandas inmuno-reactivas entre 14-21 kDa y 65-78 kDa.



DISCUSION.

Curiosamente, muchos alérgenos poseen en su composición estructural ciertas enzimas que podrían facilitar un sinnúmero de procesos biológicos naturales.

En el caso tan especial de nuestros pacientes atópicos, estas enzimas demostradas en algunas familias de pólenes y de hongos anemófilos, al igual que, en los extractos de los insectos podrían desempeñar un papel muy activo sobre los diversos componentes de la mucosa respiratoria para “anidarse” en ella o para interactuar con sus células teniendo para sí ciertas ventajas biológicas que posibilitaren su supervivencia, así como, la modificación de estructuras celulares, como los receptores Toll, tan vinculados con la absorción y penetración de péptidos extraños al organismo, antigénicos o no.

Desde la fosfatasa ácida de los pólenes de las Gramíneas hasta los más atrayentes hallazgos sobre las proteasas de algunos insectos, varios autores señalaron la posible importancia de estas enzimas en la génesis de la enfermedad respiratoria y en la producción de anticuerpos específicos.

Empleando inhibidores conocidos de clase y cromatografía de afinidad para detectar los sitios activos, se halló que la actividad proteolítica del Der p 1, perteneciente al grupo I de los alérgenos del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* exhibe una actividad combinada de cisteína-serina proteasa.

Cuando estudiamos en el pasado el ácaro *Dermatophagoides farinae* hallamos una gran variedad de enzimas entre los 25 y 30 kDa, que son serina-proteasas, como la tripsina, quimiotripsina y elastasa. Todas ellas incrementan la permeabilidad vascular, la liberación masiva de ciertas citoquinas, y la amplificación de la transmigración endotelial. Todo ello conduce a la explosiva inflamación alérgica, y también, por otro lado, a la síntesis de anticuerpos específicos dado que son proteínas de estructura tridimensional muy compleja que estimulan receptores en las células inmuno-competentes como células dendríticas, macrófagos y LB.

Por su parte, la posibilidad de que algunos antígenos de Bla-g, fueran poderosas enzimas fue postulada en 1995. Nosotros señalamos en 1987, la reactividad cruzada entre los antígenos de Bla-g y de Per-a, como lo documentamos por Ouchterlony, y en las experiencias cruzadas y directas con la hemaglutinación de Boyden.

El **Bla-g 2**, posee una homología estructural con una proteasa del grupo aspártico de 36 kDa, que, desarrollaría una actividad en el insecto como enzima de su aparato digestivo.

El **Bla-g 4**, es un ligando proteico del tipo calicina-lipocalina de 21 kDa, que es un potente inductor de anticuerpos IgE.

El **Bla-g 5**, es una glutatión-transferasa de 22 kDa.

El **Bla-g 6** es similar a la troponina.

El **Bla-g 7** equivale a la tropomiosina de 32 kDa.

El **Bla-g 8** es una miosina de 21 kDa.

El **Bla-g 9** es una arginina-kinasa.

Nuestra **Per-a** exhibió una banda de 90 kDa, muy proteolítica e inmunogénica, similar a aquella del antígeno Bd de la **Bla-g**; posiblemente sin saberlo en aquel momento, éste fuera

el antígeno común que detectamos entre ambas especies hace 20 años.

El ADN clonado de **Per-a** fue aislado y 2 proteínas importantes de 72 y 78 kDa, cada una, fueron responsabilizadas de ser los alérgenos mayores de este insecto.

Nuestros hallazgos sitúan a nuestra proteína en los 180 kDa, pero si tenemos en cuenta la sensibilidad y la capacidad resolutoria entre ambas técnicas, estos 150 kDa (sumando las dos), y los 180 kDa de nuestro hallazgo, es probable que un péptido más pequeño (de 30 kDa) hubiera quedado “atrapado” entre las 2 macromoléculas por razones fisicoquímicas difíciles de explicar o atribuidas a los métodos de extracción utilizados.

Experimentos con recombinantes proteicos atrapan ávidamente a la IgE humana, pero también pueden ser responsables del clivaje de otras proteínas del mismo alérgeno, siempre y cuando posean menor peso molecular y una estructura tridimensional más frágil.

Otros péptidos que reaccionan en forma cruzada entre **Per-a** y **Bla-g**, y, que a su vez, reaccionan con la IgE humana, poseen 12, 38, 49, 52 y 60 kDa.

Estos hallazgos podrían explicar –en parte- la presunción anterior, y, en parte, ser alguno de los integrantes de esa gran familia de los péptidos con propiedades enzimáticas de la **Bla-g**, descripta más arriba.

Esto podría deberse a que todo extracto va sufriendo procesos de autólisis o proteólisis en función del tiempo de producido, la temperatura ambiente, la conservación, la manipulación en el laboratorio, ciertas soluciones “conservantes,” etc, que si bien, preservan epitopes antigénicos útiles para la vacunoterapia, desde el punto de vista fisicoquímico, distan mucho de mantener la estructura tridimensional o estereoquímica original.

La actividad gelatinolítica de la **Per-a**, mostró un patrón con bandas de 90, 78, 65, 34, 32 y 24 kDa con una mayor actividad a pH 6 - 6,5, mientras que la **Bla-g** a pH 8,5 mostró bandas de 34 kDa.

Con el Western-blot se apreciaron bandas reactivas en los 90, 78, 65 y 34 kDa, aunque las 3 primeras compatibilizan la actividad gelatinolítica con una notable inmuno-reactividad.

Estas bandas podrían pertenecer a proteinasas del tipo serina, muy probablemente, una tripsina. Este antígeno o una sumatoria de estos 3 alérgenos inmuno-reactivos serían aquellos que empleamos oportunamente en la inmunoterapia específica en nuestros atópicos respiratorios sensibles a la **Per-a**, y que resultaron tan eficientes en la génesis de anticuerpos protectores, presumiblemente, del isotipo IgG o bien los anticuerpos “asimétricos” de Margni, con una mayor carga de hexosas y con una excelente capacidad de “bloquear” al alérgeno ofensor.

Cuando en otros trabajos analizamos la actividad enzimática del *Triatoma infestans* también logramos datos altamente positivos de proteasas del tipo serina, que, como con la **Per-a**, podrían corresponder a una tripsina o simil-tripsina.

Por su parte, **Per-a** expresando **Per-a** 1 (25 kDa) con isoformas (**Per-a** 1.0101, **Per-a** 1.0103 y **Per-a** 1.0104), **Per-a** 3 (72 kDa) y **Per-a** 7 (33 kDa), configuran los aspectos fisicoquímicos más salientes de la composición enzimática de las 2 cucarachas estudiadas, y, resaltan la importancia biomédica de las mismas en la génesis de la rinitis/asma, tan bien señalada por

el Dr. Julio F. Albónico, en su Tesis Doctoral de la Biblioteca de la Facultad de Medicina (UBA).

Tanto los sueros experimentales de conejo anti-Triatoma, como de los atópicos seleccionados en distintas provincias del NOA y del NEA, revelaron bandas entre 65 y 78 kDa, que podrían ser similares a algunas de las de la Pa, aunque una tercera banda entre los 14 y 21 kDa, podría tener algún valor inmunogénico sólo para el Triatoma.

Todos estos resultados sugieren una correlación entre la actividad gelatinolítica de algunas proteinasas y las bandas inmunoreactivas en los extractos de la **Per-a** y de la **Bla-g** y del Triatoma infestans (alergenicidad común y cruzada), tal como lo demostramos en trabajos posteriores.

Contrariamente a lo expresado por algunos autores, sugerimos que estos extractos no deberían compartir frascos-vacuna o viales terapéuticos, con otras proteínas antigénicas (v.g. pólenes), por las poderosas proteasas que contienen y, además, deberían destacar fehacientemente una fecha de vencimiento del mismo.

Tan importante es la convivencia de estos insectos con el hombre, que, una concepción médico-terapéutica, a la que, por cierto, *no adherimos*, ha generado una “medicación” para el tratamiento del asma infantil basada en un “extracto” de cucaracha.

Curiosamente, **Blatta orientalis** es un remedio homeopático que proviene de la cucaracha del mismo nombre. Este insecto se encuentra habitualmente en las cocinas y en los lugares insalubres, tales como los cuartos de los trastos. En la “terapéutica” homeopática se lo utiliza principalmente para desensibilizar el organismo, siguiendo el principio hannemaniano del “simila similibus curantur”.

Paradójicamente, el atópico se sensibiliza a estas proteasas por medio de su inhalación y/o ingestión, y, nosotros logramos la desensibilización con la inoculación progresiva y crónica por una diferente vía de estimulación del sistema inmune induciendo la síntesis de anticuerpos protectores y la modulación de las respuestas celulares con la “reeducación” de la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias.

El remedio homeopático debe administrarse en “diluciones” (cuya verdadera actividad se discute en la física clásica) en función de la velocidad de desaparición de los síntomas. Reflexiones éticas nos impiden otros comentarios.

La conclusión final de estos hallazgos destacan la importancia que los antígenos (alérgenos) provenientes de los insectos tienen en la vida de los sujetos atópicos, más allá, de su incidencia en la salud pública, como transmisores o vectores de microbios de todo tipo.

Ello nos mueve a insistir en la importancia de *combatirlos* por todos los medios a nuestro alcance, ya que, desgraciadamente en el imaginario de nuestra población, dicha trascendencia es minimizada o comprendida parcialmente.

Desde Voorhorst (1964) hasta hoy, mucho se avanzó en la investigación básica y aplicada de los alérgenos y de la atopía, corroborando todos los hallazgos realizados con mucho esfuerzo, pero poco es lo realizado desde el punto de vista de la salud pública y de su tras-

endencia etiopatogénica.-

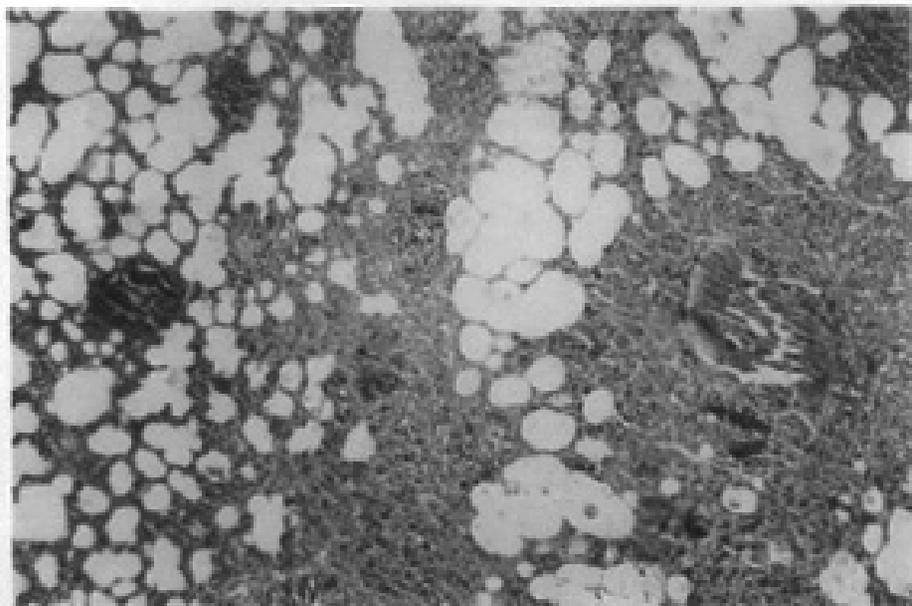


Fig. 3.- Pulmón de cobayo aerosolizado. Se observan infiltrados intersticiales intensos y granulomas solitarios. HE 1100.

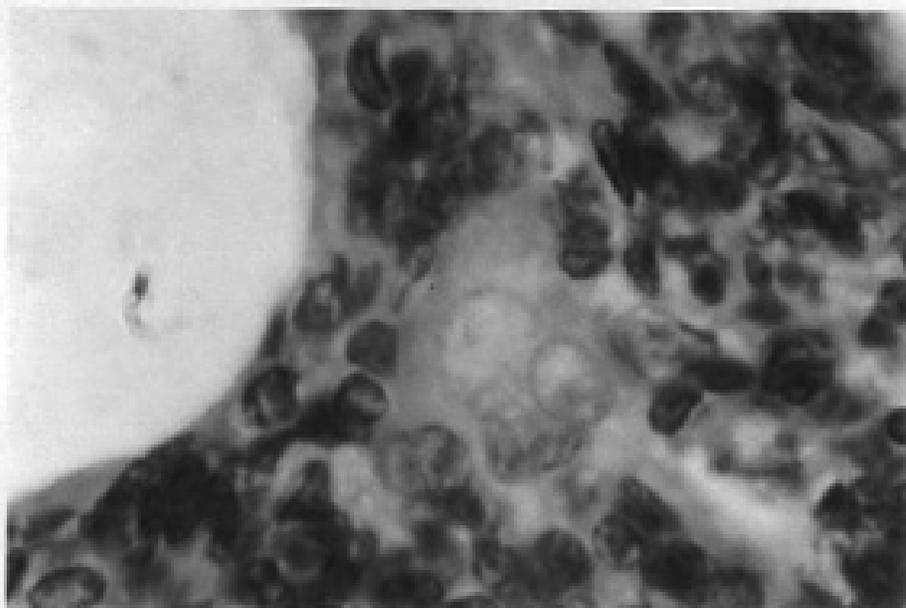


Fig. 4.- Pulmón de cobayo aerosolizado. Se observan tabiques con infiltrados mononucleares y células espumosas ("foamy"). HE X 400

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Alonso A., Scavini L.M., Albónico J.F., Mouchián K.:
"Immunochemical properties of the antigens of *Blatta americana*".
Allergol et Immunopathol., 1987; 15: 109.
- 2.- Alonso A., Albónico J.F., Belloti M., Mouchián K., Pionetti C.H. "Interstitial pneumonitis induced in guinea-pigs by the antigens of *Periplaneta americana*".
J. Invest. Allergol. Clin. Immunol., 1992; 2: 263.
- 3.- Alonso A., Albónico J.F., Mouchián K., Belloti M., Pionetti C.H. "Producción de anticuerpos IgE-anti-*Periplaneta americana* en cobayos por vía inhalatoria"
Prensa Med. Argent. 1993; 80: 100
- 4.- Alonso A., Albónico J.F., Isola E.D., Scavini L.N., Mouchián K. "Cross-reactivity between antigens of *Blatta americana* and *Triatoma infestans*" XIII International Congress of Allergology and Clinical Immunology, Montreaux (Suiza), 1998
- 5.- Alonso A., Marino G.A., Scavini L.M., Rodríguez S.M. "Immunochemical properties of the antigens of *Triatoma infestans*".
J. Invest. Allergol. Clin. Immunol. 1992; 2: 154
- 6.- Alonso A., Marino G.A., Scavini L.M., Rodríguez S.M. 'Anticuerpos IgE-anti-*Triatoma infestans* en humanos atópicos y no-atópicos '
Prensa Méd. Argent. 1994: 81: 300
- 7.- Alonso A., Caccuri R., Scavini L., Rodríguez S., Marino G. 'Interstitial pneumonitis induced in guinea-pigs by *Triatoma infestans* antigens"
J. Invest. Allergol. Clin. Immunol. 1994; 4: 197
- 8.- Anderson M.C., "Methodology for RAST-inhibition" In: *Methods of the allergenic products.* FDA. Bethesda 1986; 1-17
- 9.- Atías A., Neghme A. "Parasitología clínica" Edit. Mediterráneo. Santiago de Chile, 1993
- 10.- Barret A.J. "Classification of peptidases". *Meth. Enzymol.* 1994; 244: 1-5
- 11.- Benveniste J. "The human basophil degranulation test as an vitro method for the diagnosis of allergies" *Clin. Allergy*, 1981; 11: 1
- 12.- Boyden S.V. "The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera" *J. Exp. Med.* 1951; 93: 107
- 13.- Boyum A. "Ficoll-Hypaque method for separating mononuclear cells and granulocytes from human blood" *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1966; Suppl., 77
- 14.- Bradford M.M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*,1976; 72: 248-254.
- 15.- Ceska M., Erikson R., Varga J.M. "Radioimmunosorbent assay of allergens"
J. Allergy Clin. Immunol. 1986; 78: 436
- 16.- Chapman M.D., Marshal N.A., Saxon A. "Identification and partial purification of species specific allergens from *Triatoma protracta*" *J. Allergy Clin. Immunol.* 1986; 78: 436
- 17.- Coleman A., Colby T.V. "Histologic diagnosis of extrinsic allergic alveolitis" *Am. J. Surg. Pathol.* 1988; 12: 514
- 18.- Crowle A. (edit.) "Immunodiffusion" Academic Press, New York, 1961
- 19.- D'Andrea A. L., Torres Leedham V. M., Castagnino J. M. "Isoelectrofocusing in agarose: clinical applications" *Electrophoresis* 1985; 6: 468
- 20.- Dische Z. In: *Methods of Biochemical Analysis.* Vol. 2. Edic. D. Glick, New York, 1955; 200
- 21.- Feliú X., de la Cuesta C.G., Castillo J.G., Sanz M.L., Oehling A. "Basophil degranulation test in house dust mite allergy: diagnostic value"

- Allergol et Immunopathol, 1989; 17: 193
- 22.- Fink J.N. "Hypersensitivity pneumonitis". In: Allergy Middleton E., Reed C.E., Ellis E.F. (eds.). Mosby, St. Louis, 1983; pág. 1085
- 23.- Frugoni C. In: Alergia Clínica. Hansen K., Werner M., Ed. Salvat, Barcelona, 1970; 586
- 24.- Gleich G.J., Larson J.B. "Measurement of potency of allergy extracts by their inhibitory capacities in RAST". J. Allergy Clin. Immunol. 1974; 58: 113
- 25.- Irañeta S.G., Duschak V., Seoane M.A., Alonso A. "Proteinase and gelatinolytic activities of house dust mite and cockroach extracts" J. Invest. Allergol. Clin. Immunol. 1999; 9: 235-40
- 26.- King C. "The isolation and characterization of a novel collagenolytic serin protease allergen from the dust mite" J. Allergy Clin. Immunol. 1996; 98: 739-47
- 27.- Kradin R.L., Divertie M.B. "Usual interstitial pneumonitis is a T-cell alveolitis". Clin. Immunol. Immunopathol., 1986; 40: 224
- 28.- Laemmli U.K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". Nature, 1970; 227: 680
- 29.- Ouchterlony O. "Diffusion in gel methods for immunological analysis". Progr. Allergy, 1958; 5:1
- 30.- Ovary Z. "Immediate reactions of the skin of experimental animals provoked by antigen-antibody interaction". Progr. Allergy 1958; 5: 459
- 31.- Pick E. "Biology of lymphokines". Vol. 60. Academic Press, New York, 1979; 119
- 32.- Reinhart M.P., Malamud D. "Protein transfer from isoelectrofocusing gels: the native blot". Anal. Biochem., 1982; 123: 229
- 33.- Richerson H.B. "Hypersensitivity pneumonitis. Pathology and pathogenesis". Clin. Rev. Allergy, 1983; 1: 469
- 34.- Rohr A.S., Marshal N.A., Saxon A. "Successful immunotherapy for *Triatoma protracta* induced anaphylaxis". J. Allergy Clin. Immunol. 1984; 73: 369
- 35.- Salvaggio J.E. "Hypersensitivity pneumonitis". J. Allergy Clin. Immunol. 1987; 79: 558
- 36.- Towbin H., Gordon. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979; 9: 4350
- 37.- Upadrashta B. "T-cell localization in rabbit models of acute and chronic experimental hypersensitivity pneumonitis". J. Allergy Clin. Immunol. 1988; 81: 821
- 38.- Voorhost R., Spieskma F. "Is a mite (*Dermatophagoides* spp) the producer of the house dust allergen?". Allergy Asthma, 1964; 10: 329
- 39.- Alonso A., Potenza M., Crespo O., Rodríguez S. : "Las proteasas de los insectos como inductoras de hipersensibilidad en los humanos," Anales de la Sociedad Científica Argentina, 2003; 232: 23-39.
- 40.- Alonso A., Potenza M., Mouchian K., Albónico J., Pionetti C. : "Proteinase and gelatinolytic properties of a *Triatoma infestans* extract." Allergol et Immunopathol., 2004 ; 32 (4) ,223-227.
- 41.- Alonso A., Albónico J., Rodríguez S., Mouchián K., Scavini L. : "Cross reactivity between the antigens of *Periplaneta americana* and *Triatoma infestans*." J. Invest. Allergol. Clin. Immunol., 1996; 6 : 301-306.
- 42.- Brenner R. : Las lipoproteínas hemolinfáticas de insectos. Anales de la Sociedad Científica Argentina, 1997 ; 227 : 139-155
- 43.- Margni R.A. : Immunology, 1972; 71 : 271-282.
- 44.- Margni R.A., Cordal M. : Immunochem., 1977 ; 14 (4) : 299-303.
- 45.- Margni R.A., Parma A. : Immunology, 1983 ; 48 ; 351-359.
- 46.- Margni R.A., Perdigón G. : Immunology, 1980; 48 : 681-686.

- 47.- Margni R.A., Perdigón G. : Vet. Immunol. Immunopathol., 1986 ; 13 : 51- 61.
- 48.- Margni R.A., Balan-Morel I: Immunol. Ver., 1998 ; 163 : 77-87.-
- 49.- Alonso A., Dotmejía J., Rodríguez S.R., Mouchián K., Irañeta S.G., Albónico J.F. : Inducción de anticuerpos IgG asimétricos por la vacunoterapia con alérgenos. Pren. Méd. Argent., 2013 ; 99 (4) : 317-321.
- 50.- Apicella C.E. : Tesis de Doctorado : Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA): "Efecto del antígeno particulado sobre la síntesis de anticuerpos bloqueantes IgG asimétricos. Estudios realizados in vitro y en un modelo de alergia murino". 2012.
- 51.- Sarpong S.B. : Socioeconomic status and race as risk factors for cockroach allergen exposure and sensitization in children with asthma. J Allergy Clin Immunol., 1996 ; 97 : 1393-1401.
- 52.- Rosenstreich D.L.: The role of cockroach allergy and exposure to cockroach allergen in causing morbidity among inner city children with asthma. N. Engl J. Med., 1997; 336: 1356-1363.
- 53.- Sarpong S.B. : Cockroach allergen (Bla g 1) in school dust. J. Allergy Clin Immunol., 1997 ; 99 : 486-492.
- 54.- Bousquet J. : Specific immunotherapy in asthma : is it effective ? . J. Allergy Clin Immunol., 1994 ; 94 : 1-11.
- 55.- Helm R. : Shared allergenic activity in Asian (*Blattella asahinai*), German (*Blattella germanica*), American (*Periplaneta americana*) and Oriental (*Blatta orientalis*) cockroach species. Int. Arch.Allergy Appl Immunol., 1990; 92 : 154-159.
- 56.- Kang B. : Study on cockroach antigen as a probable causative agent in bronchial asthma. J. Allergy Clin. Immunol., 1976 ; 58 : 357-362.
- 57.- Kang B. : Cockroach cause of allergic asthma. J.Allergy Clin.Immunol., 1979; 63 : 80-85.
- 58.- Mouchián K., Albónico J.F., Pionetti C.H., Alonso A. : Cockroaches antigens and hypersensitivity pneumonitis. Fifth Armenian Medical World Congress, Paris, July 16, 1992, 27.
- 59.- Arruda L.K.: Molecular cloning of a major cockroach (*Blattella germanica*) allergen, Bla g 2 : sequence homology to the aspartic proteases. J.Biol.Chem., 1995; 270 : 19563-19568.
- 60.- Lehrer S.: Cockroach allergenic activity : analysis of commercial cockroach extracts. J.Allergy Clin.Immunol., 1992 ; 88: 895-900.
- 61.- Pollart S. : Environmental evidence of cockroach allergens. J. Allergy Clin. Immunol., 1991; 87 : 505-509.
- 62.- Pollart S. : Identification, quantification and purification of cockroach allergens using monoclonal antibodies. J. Allergy Clin. Immunol., 1991 ; 87 : 511-515.
- 63.- Schou C. : Identification and purification of an important cross-reactive allergen from American and German cockroaches. J. Allergy Clin. Immunol., 1990; 86 : 935-940.
- 64.- Stankus R. : Identification and characterization of cockroach allergens. J. Allergy Clin. Immunol., 1990; 86 : 781-787.
- 65.- Zwick H. : Allergenic structures in cockroach hypersensitivity. J.Allergy Clin. Immunol., 1991; 87 : 626-632.-
- 66.- Menon P. : Skin test reactivity to whole body and fecal extracts of American and German cockroaches. Ann Allergy, 1991; 67 : 573-577.
- 67.- Zeiler T : Recombinant allergen fragments as candidate preparations for allergen immunotherapy. J. Allergy Clin. Immunol., 1997 ; 100 : 721-727.
- 68.- Mazer B. : Cockroach as a potential agent in allergic bronchopulmonary disease : evidence for humoral and T-cell immunity. J. Allergy Clin. Immunol., 1989; 83 : 182-186.
- 69.- Okuda M. : A clinical evaluation of perennial type allergic rhinitis. Ann. Allergy, 1984 ; 53 : 178-185.

- 70.- Mailing H.J. : Indications and contraindications for allergen specific immunotherapy. ACI International, 1998 ; 10 : 76-80.
71. Prado, M.A., F. C. Pimenta, M. Hayashid, P. R. Souza, M. S. Pereira, Elucir Gir: Enterobacterias aisladas de baratas (*Periplaneta americana*) capturadas em um hospital brasileiro. Rev Panam Salud Publica, 2002 ; 11 (2): 93-97.
72. Majekodunmi, A., M.T Howard , V. Shah : The perceived importance of cockroach infestation to social housing residents. Journal of Environmental Health Research, 2002; Vol 1, Issue 2 (November): 27-34.
73. Mallis, A. : Handbook of Pest Control. 9a Ed. Editorial Director Stoy A. Hedges, B.C.E. 1-1397, 2004.
74. Harwood, R.F., M.T. James : Entomología Médica y Veterinaria. 3ª Ed.. Editorial UTE-HA. 1-615, 1993.
75. Ramírez Pérez, J.: La cucaracha como vector de agentes patógenos. Bol. Of. Sanit. Panam. 1989 ; 107 (1): 41-53.
- 76.-Fathpour, H., G. Emtiazi, E. Ghasemi : Cockroaches as Reservoirs and Vectors of Drug Resistant Salmonella spp. Iran. Biomed. J., 2003 ; 7 (1): 35-38.
- 77.-Rozendaal, F.G.: Vector control methods for use by individuals and communities. Geneva: World Health Organization, 1997 ; pp. 288-301.
- 78.-Bennett, G.W., J.H. Owens, R.M. Corrigan: Truman's scientific Guide to Pest Control Operations. 5ath Ed. A Purdue University. Advanstar Communic Project. 1997 ; 574 pp
- 79.-Sramova, H., Daniel, M., Absolonova, V., Dedicova, D., Jedlickova, Z., Lhotova, H., Petras, P., Subertova, V.: Epidemiological role of arthropods detectable in health facilities. J. Hosp. Infect., 1992 ; 20: 281-292.
- 80.-Gliniewicz, A., E. Czajka, A. E. Laudy, M. Kochman, K. Grzegorzak, K. Ziórkowska, B. Sawicka, H. Stypulkowska-Misiurewicz, K. Pancer : German Cockroaches (*Blattella germanica* L.) as a Potential Source of Pathogens Causing Nosocomial Infections. Indoor and Built Environment, 2003 ; 12 : 1-2, 55-60.
- 81.-Kutrup, B. : Cockroach Infestation in Some Hospitals in Trabzon, Turkey. Turk J Zool., 2003 ; 27: 73-77.
- 82.-Hsiu-Hua, P., W. Shu-Ching, H. Err-Lieh : Insecticide resistance in German cockroaches (*Blattella germanica*) from hospitals and households in Taiwan. Internat Jour of Environ Health Research, 2005; 15: 1 : 33 – 40.
- 83.-Mille, P., B. Peters : Overview of the public health implications of cockroaches and their management. N S W Public Health Bull, 2005 ; 15 (11-12): 208-211.
- 84.- Cochram, D. G. : Cockroaches. Biology and control. Documento de la Organización Mundial de la Salud. WHO/VBC/82. 856 pp. Ginebra. 1982.-

Tabla 1.-

Valores de la IgE sérica total y específica antes y después de la IT.

Pac n°	IgE basal KU/L	IgE-RAST-basal anti-Pa. (PRU/mL)	IgE-RAST-anti-Pa después de 5 años. (PRU/mL).
1 :	130	1,40	0,20
2 :	162	0,45	0,10
3 :	184	0,65	0,30
4 :	220	0,60	0,40
5 :	145	1,70	0,35
6 :	370	1,10	0,10
7 :	135	1,00	0,60

Grupo Control que no realizó vacunoterapia :

8 :	600	0,90	0,90
9 :	120	1,20	1,50
10 :	330	0,80	1,20
11 :	410	0,70	0,70
12 :	280	1,50	1,30

Valor promedio de la IgE sérica total basal de la población estudiada :
230,50 KU/L con un DE \pm 115,39 KU/L.

IgE específica : grupo vacunado : antes : x : 0,985 PRU/mL con un DE \pm 0,455 PRU/mL ;
después de 5 años : x : 0,29 PRU/mL con un DE \pm 0,165 PRU/mL.
 $p \leq 0.02$.

IgE específica : grupo no vacunado : antes : x : 1,02 PRU/mL con un DE \pm 0,327
PRU/mL; después de 5 años : x : 1,12 PRU/mL con un DE \pm 0,318 PRU/mL. $p = 0,50$

Tabla 2.

Valores de la IgG sérica específica antes y después de la IT.

Pac.n°	IgG-RAST-basal	IgG-RAST-anti-Pa.
	Anti-Pa.	después de 5 años
1 :	50	150
2 :	44	280
3 :	32	350
4 :	68	190
5 :	12	170
6 :	24	140
7 :	28	235
Grupo control que no realizó vacunoterapia :		
8 :	33	40
9 :	100	140
10 :	20	30
11 :	40	50
12 :	50	70

IgG-RAST-grupo vacunado : basal : $x : 36,85$ UI/ml con un $DE \pm 18,61$ UI/ml ;

A los 5 años : $x : 216,42$ UI/ml con un $DE \pm 76,34$ UI/ml ; $p \leq 0,001$.

IgG-RAST-grupo no vacunado : basal : $x : 48,6$ UI/ml con un $DE \pm 30,73$ UI/ml ;

A los 5 años : $x : 66$ UI/ml con un $DE \pm 43,93$ UI/ml ; $p = 0,50$.

Tabla 3.

Valores de la IL-2 sérica antes y después de la IT.

Pac. n°	Basal (UI/mL)	Después de 5 años. (UI/mL).
1 :	173	84
2 :	210	120
3 :	150	110
4 :	125	100
5 :	90	50
6 :	310	125
7 :	280	130

Grupo vacunado : x basal : 191,14 UI/mL con un DE \pm 80,62 UI/mL.

Después de 5 años : x : 102,71 UI/mL con un DE \pm 28,50 UI/mL. $p \leq 0,02$.

Grupo Control que no realizó vacunoterapia:

8 :	300	315
9 :	220	200
10 :	130	150
11 :	110	140
12 :	140	120

x basal : 180 UI/mL con un DE \pm 79,05 UI/mL ;

Después de 5 años : x : 185 UI/mL con un DE \pm 78,42 UI/mL. $p = 0,50$.

Tabla 4.-

Valores de la IL-4 sérica antes y después de la IT.

Pac. n°:	basal (UI/mL)	después de 5 años (UI/mL)
1 :	310	220
2 :	460	310
3 :	270	180
4 :	280	220
5 :	300	150
6 :	420	190
7 :	250	110

Grupo Control que no realizó vacunoterapia :

8 :	270	250
9 :	430	400
10 :	340	310
11 :	450	430
12 :	380	380

Grupo vacunado durante 5 años : x basal : 327,14 UI/mL con un DE \pm 74 UI/mL;x después de 5 años : 177,14 UI/mL con un DE \pm 66,81 UI/mL y p \leq 0,01.-Grupo control no vacunado : x basal : 374 UI/mL con un DE \pm 72,31 UI/mL ;x después de 5 años : 370 UI/mL con un DE \pm 75,16 UI/mL y p = 0,50.-

TABLA 5.

Valores del IL-4R sérico antes y después de 5 años de IT.

	Basal (c.p.m.)	después de 5 años (c.p.m.)
Pac. n° :		
1 :	2100	1300
2 :	2400	1700
3 :	2500	1200
4 :	3000	2200
5 :	2000	920
6 :	2800	1500
7 :	2400	1100

Grupo control que no recibió vacunoterapia :

8 :	2000	1800
9 :	2400	2200
10 :	2700	2600
11 :	2200	2200
12 :	2500	2500

Grupo vacunado por 5 años : x basal : 2482,85 c.p.m. con un DE \pm 362,60 c.p.m.;

x después de 5 años de vacunación : 1442,85 c.p.m. con un DE \pm 369,81 y p \leq 0,001.-

Grupo control no vacunado : x basal : 2360 c.p.m. con un DE \pm 270,18 c.p.m. ;

x después de 5 años : 2260 c.p.m. con un DE \pm 313,04 y p = 0,50.

(c.p.m. = cuentas por minuto en el método radioisotópico).

RELEASE OF IL-4 FROM ATOPIC AND NON-ATOPIC LYMPHOCYTES STIMULATED BY A BAT ALLERGEN.

Angel Alonso, Santiago R. Rodriguez, Krikor Mouchián,
Julio F. Albónico, Stella M. Battista.

2da. Cátedra de Microbiología- Facultad de Medicina- UBA ; División Alergia- Hospital de Clínicas José de San Martín- UBA.

Resúmen : se exponen los hallazgos obtenidos luego de incubar linfocitos de sujetos atópicos y no-atópicos con un extracto de heces de murciélago (murcielaquina) y el pico proteico de las mismas obtenido por una columna de Sephadex G-150. Los valores de la IL-4 fueron superiores en los cultivos de los linfocitos de sujetos atópicos lo que se presume vinculado con la producción de rinitis/asma en los sujetos atópicos.

Palabras clave : muricelaquina; IL-4 ; atopía; rinitis/asma; pico proteico; Sephadex G-150.

Summary : the release of IL-4 was measured in lymphocytes cultures with bat feces and its protein peak obtained by a Sephadex G-150 column. The IL-4 was high in those cultures coming from atopic patients (rhinitis/asthma) and it explains their hypersensitivity to bat antigens.

Key words : IL-4 ; bat feces ; protein-peak; atopy; rhinitis/asthma; Sephadex G-150.

INTRODUCTION and BACKGROUND.

In a previous paper it was demonstrated that a pigeon feces extract was able to cause respiratory symptoms in animals and in humans belonging to hypersensitivity types I, III and IV. In big cities, tall buildings with rolling shutters on their windows serve as refuges for bats, especially on the highest floors. Bat feces and urine then contaminate the frames and hinges of the windows, dry out and pollute the indoor environment. The bat feces were collected from outside the windows on the highest floors of tall buildings in Buenos Aires and from the inside rolling shutters. The feces appeared in small dry black grains, like rice, and had unpleasant odor ; each particle was collected with nippers and kept in a sterile reservoir. This material was processed following the Frugoni-Hansen method. The extract thus obtained was subjected to the Bradford method for the quantitative measurement of proteins

while the carbohydrate content was determined by the indol method using a mixture of galactose and mannose as standard solutions in the Metrolab spectrophotometer at 470 nm optical density (OD). ⁽¹⁻²⁻³⁻⁴⁻⁵⁻⁶⁻⁷⁻⁸⁾

On the other hand, adult albino rabbits were immunized against the whole bat feces extract. Weekly intradermal injections of an emulsion of 0,5 mL bat feces plus 0,5 mL complete Freund's adjuvant were administered during 12 weeks. The injections were adequately distributed in wheals of 0,20 mL each after gentle shaving of the hairy dorsum. Ten days after the last injection they were bled to death and the sera obtained were stored at -20° C. These antisera were checked against the bat extract with the Ouchterlony technique as well as immunoelectrophoresis and the passive hemagglutination test (Boyden) to evaluate its antigenicity in animals and the properties of the antibodies obtained. Other antigens such as bat epithelium, rat serum, rat epithelium and pigeon feces were used in order to check cross-reactivities among them.

The undiluted bat extract was subjected to gel filtration by a Sephadex G-150 column of 22 x 780 mm and elution was done with 0,15 M ClNa buffered with phosphate at pH 8 and 4° C. Only one protein peak (tubes 42-57) was obtained and also three peaks with high sugar content (tubes 13, 36 and 48). The Bradford method revealed the following contents: bat feces extract 20 mg/mL and Sephadex G-150, tubes 42-57, 15 mg/mL. The indol method revealed the following sugar contents: bat feces extract 50 mg%, Sephadex G-150, tube 13: 8 mg%, tube 36: 9 mg% and tube 48: 26 mg%. The Ouchterlony revealed one precipitin line between the rabbit antiserum and the bat extract. Negative results appeared against the other antigens. The Boyden technique showed a positive titer of 1/512 when the anti-bat serum was checked against the bat extract and 1/64 against the tubes 42-57. ⁽⁹⁻¹⁰⁻¹¹⁻¹²⁻¹³⁻¹⁴⁻¹⁵⁾

The SDS-PAGE and immunoblotting were performed with the use of an 11% polyacrylamide gel as described by Laemmli. After electrophoresis proteins were blotted by passive transfer to 0,2 µm pore-size nitrocellulose membranes. The strips were then washed twice with PBS-Tween for 10 min each and incubated for 2 hs with a mouse antirabbit-IgG antibody (1/3000 in PBS).

After washing the strips were incubated in biotinylated rabbit anti-mouse antiserum (1/5000), washed and finally incubated in a streptavidin-peroxidase (1/10.000) for 30 min. After overnight washing the strips were developed by using a chemiluminescence system. The bat feces extract and its fraction were filtered through a Millipore 0,22 µ to assume sterility. Each atopic and non-atopic patient received intracutaneously injections in the arm of 0,025 mL of bat feces and the protein peak. Saline pH 7,2 and histamine 1/1000 were used as controls.

Skin tests were read at 15 min according to the scale: 1+ : 1-4 mm; 2+ : 5-9 mm; 3+ : 10-14 mm and 4+ : more than 15 mm. None of the patients were taking antihistamines, steroids and immunosuppressive drugs. The RAST to detect specific anti-bat IgE was carried out following Ceska's technique. RAST-inhibition was carried out following Gleich methodology. In the atopic group the bat feces extract and its protein fraction revealed a 29,78% and a 21,27% positivity, respectively, with an acceptable correlation with the RAST-IgE-anti-bat feces of the same sera in 83,94% of them. The RAST-inhibition confirmed the specificity of the positive RAST reactions. Total inhibition was observed with bat feces in the positive anti-bat feces sera while no inhibition was detected with ragweed, grass pollens and cat dander. SDS-PAGE showed at least 13 different protein bands between 29 kDa and 116 kDa. Only those between 45 kDa and 66 kDa blotted the immune serum when the strips were incubated

with the anti-IgG-serum.

To study the enzymatic and proteolytic activities of the bat extract minigels of 10x10 cm each and 1,5 mm thick composed of 12% acrylamide were made with gelatin at a final concentration of 0,2%. They were run at 130 V for 2 hs. The washing and incubation of the gels were done with and without the protease inhibitors. The solutions employed were E64 (L-trans-epoxy-succinylleucyl amido (4-guanidino)-butane 20 μ M; tosyl-lysyl-chloro-methyl-ketone (TLCK) 100 μ M; tosyl-phenyl-alanyl-chloro-methyl-ketone (TPCK) 1 mM; phenyl-methyl-sulphonyl-fluoride (PMSF) 10 mM; leupeptin 100 μ M ; o-phenantroline 1 mM and pepstatin-A 2 μ M. ⁽¹⁶⁻¹⁷⁻¹⁸⁻¹⁹⁻²⁰⁾.

Bat in SDS-PAGE showed 6 to 8 bands between 21 to 97 kDa. The gelatinolytic activity of the bat in SDS-PAGE with copolymerized gelatin as substrate was recorded. The proteolytic activity pattern of bat was analyzed at three pH levels : 3,5 ; 6 and 8,5. The highest enzyme activity was at pH 8,5 with less activity at pH 6 and no activity at pH 3,5. Total activity pattern at pH 8,5 was highly sensitive to TLCK and PMSF. The major and broad band (65 kDa) and the minor (31 kDa) showed the same inhibition pattern. Hence a trypsin-like serine protease was tentatively characterized. Meanwhile all the proteins separated by SDS-PAGE showed immunoreactivity in the Western-blot with a polyclonal rabbit anti-bat serum only 2 bands (21 and 40 kDa) reacted with the human atopic sera suggesting correlation between allergenicity and gelatinolytic protease activity.

MATERIALS and METHODS.

1.- Patients : we selected 30 adult persons suffering an atopic disease (rhinitis/asthma, pollenosis, vernal rhinoconjunctivitis) with a strong familial history of atopy and with high serum IgE levels (210 \pm 74 KU/L). They also showed highly positive skin tests performed with several allergens such as mites, cockroaches, moulds and pollens. They were 20 women and 10 men aged between 22 and 78 years with good health and only submitted to antihistamines and β 2 agonists aerosols ad libitum. On the other hand, we choose another 20 persons, 10 women and 10 men aged 25 to 75 years old, in good health that did not suffer any atopic condition and did not have familial background of atopy. They were the control group of the experiment and revealed only 18 \pm 15 KU/L of serum IgE. They were not using antihistamines, steroids or immunosuppressive drugs at the time of the vein puncture to obtain the blood. All of them signed the informed consent.

2.- Lymphocytes culture : ten milliliters of blood were obtained from the vein of the elbow of each person and they were submitted to Boyum's technique to separate blood lymphocytes in a Ficoll-Hypaque gradient (density 1,077 g/cm³) and then kept in a culture medium as RPMI 1640 (Gibco). The cells were separated by each donor so we have 50 different wells to incubate the cell suspension with the bat antigen and with the protein peak obtained by Sephadex G-150 (tubes 42-57) and to measure after 24 hours the quantity of IL-4 release in the well by the cell. The measurement of IL-4 was carried out using a mouse anti-human IL-4 (Sigma Chemical Co., clone n° 34019.111) by ELISA. A system PAP-anti-PAP was used as a enzymatic indicator to read the result. Lymphocytes from atopic and non-atopic patients were submitted to the same methodology.

3.- Statistical analysis : differences were considered to be statistically significant at p values <0,05.

RESULTS.

They are summarized in Tables I and II.

TABLE I
VALUES OF ATOPIC LYMPHOCYTIC IL-4 IN CELL CULTURE (UI/mL).

Ages	Incubated with bat allergen extract (13 mg/mL)	Incubated with the protein peak tubes 42-57 (13 mg/mL)
20-29	140	70
30-39	96	65
40-49	169	74
50-59	189	90
60-69	110	64
70-79	88	62
	X: 132	X: 70,83
	DE ± 40,98	DE ± 11,10

TABLE II.
VALUES OF NON-ATOPIC LYMPHOCITYC IL-4 IN CELL CULTURE. (UI/mL).

Ages	Incubated with bat allergen extract (13 mg/mL)	Incubated with protein peak (tubes 42-57) (13 mg/mL)
20-29	6	3
30-39	4	5
40-49	2	4
50-59	14	7
60-69	18	12
70-79	9	1
	X: 8,83	X: 5,33
	DE ± 3,13	DE ± 1,84

DISCUSSION.

When we compare the results obtained with the whole bat allergen extract and its protein peak we realize that the values of IL-4 in the cell culture of human lymphocytes coming from atopic versus non-atopic patients are very near to a significant $p < 0,001$ considering that spontaneously the atopic or non-atopic lymphocytes did not release IL-4 without stimulation.

It is possible that the reactivity strictly atopic of the lymphocytes coming from patients suffering rhinitis and bronchial asthma could be attributed to other physicochemical factors like proteases of the serine or trypsine types. These products could amplify the response and also explain the IL-4 released by the non-atopic lymphocytes as it was observed in the control group.

It was also interesting that in the atopic group the ages between 40 and 60 years old were the most significant in the amount of cytokine released. Perhaps a chronic mucous contact with the antigen is the main responsible of this finding.

On the other hand, we realize that the number of the patients involved in this study is very low and perhaps a greater number of atopic and non-atopic patients are necessary to sustain or modify these conclusions specially if we take into account that the atopic population is near to the 18-20% of the general population and that not everyone lives in apartments of tall buildings or very old houses occupied by bats colonies.

REFERENCES.

- 1.- Spiewak R., Johansson S., Wütrich B.: Berufbedingtes asthma auf fledermaüse. *Allergologie*, 1996; 19 (11) : 509-511.
- 2.- Alonso A., Irañeta S.G., Rodríguez S.M., Scavini L.M.: Bat feces as an indoor allergen. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, 1998; 8 : 365-369.
- 3.- Alonso A., Mouchián K., Albónico J.F., Pionetti C.H., Potenza M., Bignone M.L.: Neumonitis por hipersensibilidad inducida en cobayos por los antígenos de las heces del murciélago. *Allergol et Immunopathol.*, 2003 ; 31 : 215-220.
- 4.- Barret A.J. : Classification of peptidases. *Meth Enzymol.*, 1994; 244 : 1-15.
- 5.- Cazzullo J.J. : Some kinetic properties of a cysteine-proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Acta*, 1990; 1037 : 186-191.
- 6.- Frugoni C. : Preparación de extractos alérgicos. In : *Alergia Clínica*. Hansen K., Werner M., (Eds), Salvat, Barcelona, 1970, pág. 586.
- 7.- Bradford M.M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye. *Anal Biochem.*, 1976 ; 72 : 248-254.
- 8.- Laemmli U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970 ; 227 : 680-686.
- 9.- Hensen C. : Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem.*, 1980 ; 102 : 196-202.
- 10.- Panneerselvam M. : Chromatographic purification and homogeneity of extracellular acid proteinases of *Aspergillus fumigatus*. *Ital J Biochem.*, 1980 ; 29 : 102-112.
- 11.- Towbin H., Staehlin T. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979 ; 76 : 4350-4354.
- 12.- King C., Simpson R.: The isolation and characterization of a novel collagenolytic serim protease allergen (Der p 9) from the dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Allergy Clin Immunol.*, 1996 ; 98 : 739-747.
- 13.- Irañeta S.G., Duschak V., Rodríguez S.M., Seoane M.A., Albónico J.F., Alonso A. : Proteinase and gelatinolytic activities of house-dust mite and cockroach extracts. *J. Invest Allergol Clin Immunol.*, 1999; 9 : 235-240.
- 14.- Alonso A., Pionetti C.H., Scavini L.M., Mouchián K. Immunochemical properties of the antigens involved in the pigeon breeder's disease. *Allergol et Immunopathol.*, 1988; XVI : 347-352.
- 15.- Dische A. : The indol method. En: Glick D. eds. *Methods of Biochemical Analysis*. New York. Academic Press. 1958 ; 2 : 200-210.
- 16.- Crowle A.: Precipitin antibodies. En : *Immunodiffusion*. New York. Academic Press.

1961 ; 46-67.

17.- Ouchterlony O. : Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy*, 1958 ; 5 : 1-9.

18.- Boyden S.V. : The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J Exp Med.*, 1951 ; 93 : 107-112.

19.- Ceska M. : Radioallergosorbent assay of allergens. *J. Allergy Clin Immunol.*, 1972; 49

: 1-10. 20.- Gleich G.J. : Measurement of potency of allergy extracts by their inhibitory capacities in RAST. *J Allergy Clin Immunol.*, 1974; 158 : 113-119.

EX DIRECTORES DE LOS ANALES DE LA SOCIEDAD CIENTÍFICA ARGENTINA (*)

Ing. Pedro Pico	Ing. Guillermo White
Ing. Luis A. Huergo	Dr. Valentín Balbín
Dr. Carlos Berg	Ing. Luis A. Viglione
Dr. Estanislao S. Zeballos	Dr. Carlos María Morales
Ing. Eduardo Aguirre	Ing. Jorge Duclout
Ing. Carlos Bunge	Ing. Miguel Iturbe
Dr. Angel Gallardo	Ing. Domingo Nocetti
Dr. Félix F. Outes	Ing. Santiago Barabino
Dr. Horacio Damianovich	Dr. Eduardo Carette
Ing. Julio R. Castiñeiras	Dr. Claro D. Dassen
Ing. Emilio Rebuelto	Ing. Alberto Urcelay
Ing. José S. Gandolfo	Dr. Reinaldo Vanossi
C. de Nav. Emilio L. Díaz	Dr. Andrés O. M. Stoppani
Dr. Pedro Cattáneo	Dr. Eduardo A. Castro
	Dr. Alfredo Kohn Loncarica

(*) Desde 1876 a 1902: Presidente de la Comisión Redactora.

PRESIDENTES HONORARIOS DE LA SOCIEDAD CIENTÍFICA ARGENTINA

1.- Prof. Dr. Andrés O. STOPPANI † (1915 - 2003)

2.- Dr. Carlos Pedro BLAQUIER (1927)

Director Administrativo: Lic. J. M. Lentino

Secretarios Administrativos: Sra. Natalia Lentino y Sr. Pablo A. Riquelme

INSTITUTOS DE LA SCA

Coordinador: Dr. N. Sarubinsky Grafín.

Directores:

- **De Historia de las Ciencias:** Prof. N. I. Sánchez.
- **De Energías Renovables:** Prof. H. Bosch – Dr. R. Vaccaro.
- **De Investigaciones Junguianas:** Prof. Dr. A. Las Heras.
- **De Tecnología de los Alimentos:** Lic. A. Bosch.
- **De Investigación e Innovación Productiva:** Ing. Prof. J. J. Sallaber.
- **Sánchez Labrador:** Prof. Dr. J. Sellés Martínez.
- **De Comunicaciones Digitales:** Ing. E. Draier.
- **De Investigación del HACRE:** Prof. R. P. Rothlin.
- **Del Boletín electrónico:** Lic. E. Laplagne.

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

Las siguientes *Instrucciones para los autores* constituyen el reglamento de publicaciones de los ANALES DE LA SOCIEDAD CIENTÍFICA ARGENTINA.

1) Generales

Los ANALES DE LA SOCIEDAD CIENTÍFICA ARGENTINA constituyen una revista multidisciplinaria, fundada en 1876, que considera para su publicación trabajos de cualquier área de la ciencia.

Los originales deben ser enviados al director, a Av. Santa Fe 1145, Buenos Aires, CP.:1059, República Argentina, en tres copias en papel, a dos espacios, tamaño carta, acompañados de su correspondiente CD. Los CD deberán estar rotulados con el nombre del autor o del primer autor si son varios haciendo constar el sistema computacional usado para grabar el mismo, el tipo y versión del procesador utilizado y nombres de los archivos.

Los autores serán notificados de inmediato de la recepción de sus originales. Dicha notificación no implica la aceptación del trabajo. Los originales son enviados a uno o más árbitros, quienes asesoran al director y a la comisión de redacción acerca de la aceptación, rechazo o sugerencia de modificaciones. La decisión final respecto a la publicación o no del trabajo es solamente responsabilidad del director.

Los originales remitidos para su publicación en los ANALES deben ser inéditos y no hallarse en análisis para su publicación en otra revista o cualquier otro medio editorial.

Todo trabajo aceptado en los ANALES no podrá ser publicado en otro medio gráfico sin previo consentimiento de la dirección.

Los ANALES se reservan el derecho de rechazar sin más trámite a aquellos originales que no se ajusten a las normas expuestas en la presente guía de *Instrucciones para los autores*.

Los ANALES constan de las siguientes secciones:

- artículos de investigación
- notas breves de investigación
- artículos de revisión y/o actualización
- editoriales
- recensiones
- cartas a la dirección
- informaciones del quehacer de la SOCIEDAD CIENTÍFICA ARGENTINA
- informaciones científicas y académicas de interés general

Los autores, al remitir sus trabajos, deberán hacer constar la sección, a la que según su juicio, corresponden sus aportes y consignar claramente la dirección postal, teléfono, fax y dirección electrónica (si la tuviere) a la cual se remitirá toda información concerniente al original.

2) Originales

Los ANALES DE LA SOCIEDAD CIENTÍFICA ARGENTINA publicarán trabajos escritos en los idiomas: español, francés, inglés y portugués.

Los originales deberán respetar la siguiente estructura:

1ª página:

- Título del trabajo: no mayor de veinticinco (25) palabras
- Nómina de los autores, institución o instituciones a la que pertenecen cada uno de ellos.
- Institución en la que se llevó a cabo el trabajo en el caso que difiera de la institución de pertenencia.
- Domicilio postal y electrónico (si lo tuviere)

2ª página:

- Resumen en idioma español de no más de 400 palabras, con su correspondiente traducción al inglés. La traducción al inglés deberá incluir el título del trabajo cuando éste haya sido escrito en español y viceversa, si el trabajo se halla escrito en inglés el resumen en español deberá incluir la traducción del título.
- La inclusión de resúmenes en francés y portugués es facultativa de los autores.
- Palabras claves para el registro bibliográfico e inserción en bases de datos, en español e inglés.

En las páginas siguientes se incluirán las secciones Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Agradecimientos y Referencias. A continuación se agregarán las tablas con sus títulos, leyendas de las figuras y gráficos y finalmente las figuras y gráficos preparados como se indica más abajo.

El tipeado del manuscrito deberá hacerse a doble espacio en papel tamaño carta (aprox. 21 cm x 29cm), dejando 3 cm de márgenes izquierdo, superior e inferior, debiéndose numerar secuencialmente todas las páginas.

No se aceptará la inserción de notas de pie de página. Cuando ello sea necesario, se deberá incluir tales notas en el mismo texto.

Se recomienda emplear el Sistema Métrico Decimal de medidas y las abreviaturas universales estándar.

Solo se permitirá el empleo del Sistema Internacional de Unidades para las medidas.

Como regla general no se deberá repetir la misma información en tablas, figuras y texto. Salvo en casos especiales que justifiquen alguna excepción se aceptará presentar esencialmente la misma la información en dos formas simultáneas.

Cada sección se numerará consecutivamente, recomendándose no emplear subsecciones.

3) Tablas

Las tablas deben prepararse en hojas aparte y a doble espacio. Las mismas incluirán un título suficientemente aclaratorio de su contenido y se indicarán en el texto su ubicación, señalándolo con un lápiz sobre el margen izquierdo.

Cada tabla se numerará consecutivamente con números arábigos. Solo se deberá incluir en las tablas información significativa, debiéndose evitar todo dato accesorio y/o que pueda ser mejor informado en el mismo texto del trabajo.

Cada tabla se tipeará en hoja separada.

Los títulos de las filas y las columnas deben ser lo suficientemente explícitos y consistentes, pero al mismo tiempo se recomienda concisión en su preparación.

4) Ilustraciones

Las ilustraciones (gráficos y fotografías) deberán ser de suficiente calidad tal que permitan una adecuada reproducción debiéndose tener en cuenta que la reproducción directa de los mismos conlleva una relación entre 1:2 y 1:3. Todas las ilustraciones se numerarán consecutivamente y en el reverso de las mismas se indicarán con lápiz blando el nombre de los autores, el número de la misma y cuando corresponda la orientación para su pertinente impresión.

Los títulos de las ilustraciones se tipearán en hoja aparte, debiéndose denotar el posicionado de las mismas en el texto por medio de una indicación con lápiz en el margen izquierdo.

Las dimensiones de las ilustraciones no deberán exceder las de las hojas del manuscrito y no se deberán doblar.

Los gráficos se dibujarán con tinta china sobre papel vegetal de buena calidad y por los mismos medios se incluirán los símbolos, letras y números correspondientes. No se deberá tipear símbolo, letra o número alguno en los gráficos y fotografías.

Enviar un original y dos copias de cada ilustración. Las fotografías solo se podrán enviar en blanco y negro, ya que que no es posible imprimir fotografías en otros colores.

Cada ilustración se presentará en hoja separada.

5) Referencias

Los ANALES adoptan el sistema de referencias por orden, el cual consiste en citar los trabajos en el orden que aparecen por medio de número cardinal correspondiente. Los libros se indicarán en la lista de referencias citando el/ los autor/es, título, edición, editorial, ciudad, año y página inicial. Para indicar capítulo de libro se añadirá a lo anterior el título del mismo y el nombre del editor.

El listado de referencias se tipeará en hoja separada y a doble espacio. Se recomienda especialmente a los autores emplear las abreviaturas estándar sugeridas por las propias fuentes.

Solo se admitirán citas de publicaciones válidas y asequibles a los lectores por los medios normales debiéndose evitar recurrir a informes personales, tesis, monografías, trabajos en prensa, etc., de circulación restringida.

Lo que sigue son algunos ejemplos de citas bibliográficas en la lista de referencia:

Publicación periódica: A. M. Sierra y F. S. Gonzalez, J. Chem. Phys. 63 (1977) 512.

Libro: R. A. Day, How to write and publish a Scientific paper, Second Edition, ISI Press, Philadelphia, 1983, p 35.

Capítulo del libro: Z. Kaszab, Family Tenebrionidae en W. Wittmer and Buttiper (Eds.) Famma of Saudi Arabia, Ciba-Geigy, Basel, 1981, p3-15.

Conferencia o Simposio: A. Ernest, Energy conservation measures in Kuwait buildings. Proceedings of the First Symposium on Thermal Insulation in the Gulf States, Kuwait Institute for Scientific Research, Kuwait, 1975, p 151.

Se recomienda revisar cuidadosamente las citas en el texto y la lista de referencias a los efectos de evitar inconsistencias y/u omisiones.

Pruebas: todo artículo deberá ser revisado en la forma de prueba de galera por el autor indicado en la carta de presentación del trabajo, la cual se devolverá debidamente corregida a las 72 horas de recibida a la redacción de los ANALES. No se admitirá en forma alguna alteración sustancial del texto y en caso imprescindible se procederá a la inclusión al final del trabajo de lo que correspondiera bajo el título de “ Nota agregada en la prueba”.