

# **Polutantes ambientales no convencionales. Papel de las proteasas de la cucaracha *Periplaneta americana* y del reduvído *Triatoma infestans***

**Ángel Alonso**

## **Resumen**

Se exponen los datos sobre la antigenicidad de las proteasas de la cucaracha *Periplaneta americana* y de la vinchuca *Triatoma infestans* en seres humanos residentes en la CABA y Gran Buenos Aires, así como en las provincias del norte y noreste del país. La antigenicidad cruzada entre ambas las convierte en 2 insectos de gran importancia en el ecosistema, y sus restos momificados de estadios adultos y ninfales de trascendencia para diversas patologías infecciosas y respiratorias.

## **Abstract**

Data concerning the cross-reactivity between the serin-proteases of the cockroach *Periplaneta Americana* and the reduviid *Triatomainfestans* are exposed. Humans living in Buenos Aires as well as those living in the north of the country inhale mummified particles containing the powerful antigens of both insects and develop chronic respiratory illnesses.

## **Introducción y antecedentes de investigación.**

La *Periplaneta americana* (Pa) o cucaracha americana o *Blattaria americana* o sudamericana o cucaracha roja, es en realidad originaria del Africa tropical donde fue identificada científicamente. La taxonomía (Linnaeus, 1758), revela que pertenece al Reino Animalia, Filo Arthropoda, Clase Insecta, Subclase Pterygota, Infraclasse Neoptera, Orden Blattodea, Familia Blattidae, Género *Periplaneta*, Especie Americana. Es una plaga urbana muy difícil de erradicar conjuntamente con *Blatta orientalis* y *Blattella germánica*. Presentan dimorfismo sexual siendo la hembra algo mayor que el macho (hasta 40 mm). Poseen alas que les permiten vuelos muy cortos a los machos por

ser más estilizados en su cuerpo. Su anatomía se divide en cabeza, tórax y abdomen, y poseen antenas, ojos, fémur, tibia, tarsus, tegminas, alas y cercus. Viven en áreas húmedas con temperaturas medias de 25-29° C, ya que no soportan el frío. Como tienen ftofobia, prefieren lugares oscuros, como grietas, sótanos, alcantarillas, etc. Se alimentan de materias en descomposición y restos de comidas, aunque algunos autores señalan que pueden ingerir papeles o telas sucios o descartados. Las cucarachas son ovíparas excepto la *Diploptera punctata* que es vivípara. La ooteca se fija a una superficie por medio de pegamentos de las glándulas bucales, se forman cada 7 días, con 15-20 huevos cada una, y a los 50 días dan lugar a las ninfas que rompen la ooteca. Poseen una metamorfosis paurometabólica, o sea, que las inmaduras se parecen a las adultas aunque sin órganos sexuales. Son maduras luego de 10-15 mudas. Son transmisoras mecánicas de patógenos bacterianos, virales, micóticos y parasitarios, y por su contacto con los alimentos son un grave problema sanitario. Así, se demostró la presencia de especies de *Salmonella*, *Pseudomona aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Nocardia* sp., *Mycobacterium leprae*, *Shigella* sp., *Serratia marscesens* y *Clostridium perfringens*. Entre los parásitos más comunes se hallaron huevos o larvas de *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Entamoebas histolytica* y *coli*, *Giardia lamblia*, *Hymenolepis nana* y *diminuta*, *Necator americano*, *Trichuris trichura*, *Lophomonas blattarum*, *Leptomonas* sp., *Leidynema appendiculatum*, *Hammerschmid tielladiesingi*, *Blastocytis hominis*, *Cryptosporidium* sp e *Iodamoeba bütschilli*. Hongos como *Aspergillus fumigatus* y *niger* también contaminan sus heces y patas.<sup>(38)</sup>

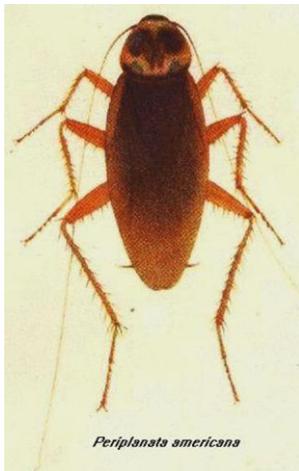
Por otro lado, Kern (1921) y Cooke (1922) llamaron la atención acerca del papel que jugaría la inhalación del polvillo habitacional (PH) en los pacientes con signo-sintomatología respiratoria (síndrome rinitis/asma). En 1940, Boatner, y en 1942, Sutherland, purificaron muestras del PH de los afectados, y sugirieron que los insectos tendrían un papel en la

etiopatogénesis del síndrome. Pasaron 22 años para que en 1964, Voorhorst, ratificara que el ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) era el responsable del cuadro. <sup>(27)</sup>. Sin embargo, en 1971, 1976, 1978 y 1979, Kang y Bernton responsabilizaron a los detritos de las cucarachas como otros responsables de la patología respiratoria, y comprobaron que los respondedores a los ácaros también lo eran a las cucarachas, enfatizando la trascendencia del hábitat de los enfermos <sup>(31-37)</sup>. A partir de 1980, estudiamos las propiedades inmunoquímicas de un extracto de Pa, obtenido a partir de las estructuras quitinosas del insecto pues éstas al momificarse pasan a integrar el PH <sup>(40)</sup>. Dado que el *Triatoma infestans* (Ti) es otro insecto que parasita casi todo el país, y es como una “cucaracha rural”, a partir de 1984, se aplicó similar estrategia de investigación para valorar su papel en enfermos respiratorios de varias provincias del norte y noreste argentino. <sup>(9)</sup>. El Ti fue obtenido por la generosa contribución de la Prof. Consulta Dra. Elvira D. de Isola, de la Primera Cátedra de Microbiología de la Facultad de Medicina (UBA), quien donó insectos libres de infección parasitaria. Los triatomíneos son reduvídeos hematófagos de gran importancia sanitaria, que son conocidos como vinchucas, chipos, chirimachas, pitos, chinches aladas, barbeiros, conesone bugs y kissing bugs, según la zona de América del Sur, Central y del Norte, en que se los halle. Son un centenar de especies silvestres que se encuentran en nidos de aves, ooquedades de los árboles, madrigueras y cúmulos de piedras. Las más importantes son las que se habituaron a colonizar las viviendas humanas (Ti, dimidiata, sórdida, rubrovaria, eratyirusiforme y spinolai). <sup>(25)</sup>. Poseen una cabeza con una trompa picadora, ojos compuestos, antenas finas y largas, tórax muy queratinizado y 2 pares de alas; el abdomen permite su diagnóstico por sus manchas distintivas. Son lucífugas y nocturnas y pican, sin dolor, cuando la víctima está dormida. Ahí defecan y liberan parásitos que albergaban en su intestino, y que, por rascado la víctima introduce en su organismo, e inicia la transmisión de la enfermedad de Chagas-Mazza o tripanosomiasis americana. Hay especies fitófagas que no agreden a los mamíferos, pero que desde el punto de vista antigénico poseen similar importancia por

la inhalación de sus desechos momificados y excretas, que son inhalados (e ingeridos) por las personas. Pasan por 5 estadios ninfales con un ciclo lento de varios meses dependiendo de la temperatura y humedad ambientales. (Figs. 1 y 2).

El objetivo de este estudio fue valorar la antigenicidad en modelos animales y en seres humanos con el síndrome rinitis/asma de los antígenos provenientes de la Pa y del Ti, analizando la posible reactividad cruzada entre ambos dada la notable polución de estos 2 insectos en la geografía argentina.<sup>(1-7)</sup>.

***Figura 1. Periplaneta americana***



**Figura 2.** *Triatoma infestans*



### **Materiales y métodos.**

- 1.- Antígenos : extractos del cuerpo entero de Pa y de Ti se prepararon según las pautas descriptas por Frugoni y Hansen. Con cada uno, por separado, se inmunizaron conejos durante 13 semanas, con 0,5 ml del extracto puro más 0,5 ml del adyuvante de Freund completo; luego de 10 días de la última inoculación fueron sangrados a blanco y los sueros guardados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . <sup>(18)</sup>.
- 2.- Fraccionamiento por columnas de Sephadex G-200 (de 22 mm x 780 mm) y DEAE-celulosa (de 25 mm x 380 mm): 5 ml de cada extracto se pasaron, separadamente, y se eluyeron con buffers de fosfato 0,15 M ClNa, pH 8 a  $4^{\circ}\text{C}$ , para Sephadex, y de 0,01 M a 0,5 M, pH 8 a pH 6, para DEAE-celulosa. Las proteínas y los azúcares se midieron en un espectrofotómetro Metrolab a 280 nm y 470 nm de densidad óptica, respectivamente.
- 3.- Cuantificación de proteínas, de hexosas y de pesos moleculares : el método de Bradford<sup>(12)</sup> midió las proteínas y el del indol los azúcares; se compararon con marcadores estandarizados conocidos y se detectaron por escala semilogarítmica los pesos moleculares de la Pa y del Ti.
- 4.- Técnicas inmunológicas: se aplicaron a los sueros de conejos inoculados con Pa y Ti, el Ouchterlony, la hemaglutinación

pasiva de Boyden y la inmunolectroforesis.<sup>(11-15-23)</sup> 5.- Pacientes :

**Grupo A** : 50 atópicos, 29 mujeres y 21 varones con edades entre los 19 y 54 años, con rinitis perenne/asma bronquial, empeoramiento con el PH y prueba cutánea positiva de  $\geq 10$  mm con el Dpt, residentes de la CABA y Gran Buenos Aires; **Grupo B** : 50 atópicos, 27 mujeres y 23 varones con edades entre los 22 y 48 años, residentes desde, por los menos, 10 años en las provincias de Santiago del Estero, Chaco, Corrientes y Misiones, con similar cuadro respiratorio; **Grupo C** : 25 personas, 18 mujeres y 7 varones sin enfermedad respiratoria ni antecedentes heredofamiliares de atopía, con edades entre los 18 y 33 años, residentes en la misma zona geográfica, y el **Grupo D** : 25 personas, 10 mujeres y 15 varones, de la CABA, sin enfermedad respiratoria ni antecedentes heredofamiliares de atopía, con edades entre 25 y 55 años, que colaboraron como controles, y que también cumplieron el consentimiento informado como los experimentales.

6.- Pruebas cutáneas de hipersensibilidad inmediata :se emplearon como antígenos, el PH, el Dpt, la Pa , el Ti, y los picos proteicos de Pa (76 y 100) y de Ti (20 y 50) de Sephadex G-200, en la dilución 1/100. Se valoró el eritema-pápula a los 20 min en comparación con los habones de histamina (control positivo) y de solución fisiológica pH 7,2 (control negativo). Fue positiva toda prueba  $\geq 5$  mm. Los pacientes no habían ingerido ningún fármaco que interfiriera la reacción cutánea.<sup>(1-39)</sup>

7.- Radioinmunoensayos : el PRIST valoró la IgE sérica total siendo normal hasta 120 KU/L; el RAST fue fabricado con los extractos de Pa y Ti (13 mg/ml de c/u), unidos covalentemente a discos de celulosa (SS547) bajo bromuro de cianógeno a pH 11 por 2 hs en medio alcalino. Se midió en PRU/ml, siendo significativos los valores superiores a 0,35 PRU/ml. El RAST-inhibición valoró la especificidad al emplear antígenos no relacionados.<sup>(8-13-19)</sup>

8.- SDS-PAGE y Western-blots : 20 mcl de Pa y de Ti se sembraron en geles de poliacrilamida al 15% (Laemmli), y luego de corridos, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, para ser incubadas con anti-Pa y anti-Ti durante la noche; luego se incubaron con anti-IgG y anti-IgE conjugados con peroxidasa, para la detección colorimétrica.<sup>(22-24-26)</sup> 9.- Ensayos de actividad

enzimática :minigeles de 10 x 10 cm c/u de poliacrilamida al 12% con gelatina al 0,2%, sembrados con Pa y Ti, se corrieron 2 hs a 130 V. Lavados con tritón-X-100 0,15%, incubados con MES pH 6 en Tris-AcH 100 mM a pH 3,5 y pH 8,5, se colorearon con azul de Coomassie R-250, y decoloraron con metanol-acético. Para inhibir las proteasas se usaron reactivos específicos para cada una de ellas.<sup>(10-17-20)</sup>. 10.- Electroforesis capilar : se desarrolló en Bio-Rad (Hércules, California, USA) con extractos de Pa y Ti en un Bio-Focus 3000, de acuerdo a las pautas del laboratorio en tiempo y potencia eléctrica. Se valoraron los trazados y la superposición de imágenes. 11.- Vacunoterapia (inmunoterapia) con antígenos de Pa : los pacientes atópicos recibieron durante 3 años inyecciones semanales por vía subcutánea del extracto de Pa desde 1 mg/ mL hasta 13 mg/mL valorándose los niveles séricos de las IgE e IgG-anti-Pa, así como, de las IL-2, IL-4 e IL-4R, cuyos datos se exponen en las Tablas 1 a 5.

## **Resultados.**

Las columnas de Pa mostraron proteínas por Sephadex G-200 entre los tubos 76-115 y por DEAE entre 190-290; las hexosas ocuparon los tubos 12,64 y 102, en la primera, y los tubos 70,100 y 150 en la segunda. El Ti las reveló por Sephadex entre los tubos 18-22 y por DEAE entre 45-55; las hexosas aparecieron en los tubos 15-25 y 36, en la primera, y los tubos 42-48 en la segunda. El Bradford detectó 42 mg/ml de proteínas en Pa y 13 mg/ml para Ti mientras las hexosas eran de 2000 mcg/ml para Pa y de 920 mcg/ml para Ti. Estos datos abogan por la composición glucoproteica de Pa y de Ti, que como inmunógenos produjeron anticuerpos específicos en conejos revelados por el Ouchterlony, Boyden e inmunoelectroforesis, con bandas de precipitación e identidad de Pa con Blatta germánica, y títulos de 1/1024 en el Boyden; el Ti detectó anticuerpos específicos 1/4096 en el Boyden y bandas de precipitación contra Pa en una reacción cruzada, lo que sugirió epitopes comunes entre los extractos. Las absorciones de los sueros de conejo anti-Pa y anti-Ti, realizadas con Pa y Ti, en forma directa y cruzada, fueron positivas, siendo más notorias las de la Pa que las del Ti, posiblemente, por mayor riqueza proteica y antigénica, y por razones fisicoquímicas de

interferencia inespecífica. El peso molecular de Pa fue de 180 kDa y el del Ti de 92 kDa, aproximadamente. Los pacientes testificados del **Grupo A** (IgE total  $225\pm 45$  KU/L) revelaron positividad al PH, Dpt y Pa y sus picos proteicos y no al Ti; los del **Grupo B** (IgE total  $267\pm 52$  KU/L) mostraron positividad al PH, Dpt, 28 al Ti y sus picos proteicos y 10 a Pa y sus picos proteicos; el **Grupo C** (IgE total  $55\pm 12$  KU/L) exhibió positividad al Ti en un caso, y negatividad al resto, y el **Grupo D** (IgE total  $33\pm 15$  KU/L) no evidenció reactividad a ningún antígeno. En los sueros positivos las IgE-RAST-anti-Pa y anti-Ti fueron superiores a 0,35 PRU/ml. El RAST-inhibición ratificó la especificidad de las reacciones al presentar negatividad con epitelio de gato y pólenes de Ambrosia y Lolium perenne como antígenos alternativos. La vacunoterapia con Pa mostró el descenso de la IgE-anti-Pa y el ascenso de la IgG-anti-Pa al cabo de los 3 años de inoculación, al igual que, los cambios favorables de las citoquinas estudiadas que expresaron una menor actividad inflamatoria en los pacientes respiratorios. El SDS-PAGE reveló 13 bandas proteicas que al ser marcadas con  $I^{125}$  detectó unión a 3 de ellas coincidentes con los tubos 18-21, 22 y 45-55, con patrones a pI de 4,5-5,0. La gelatinólisis fue notable a 56 kDa y la proteólisis a pHs 4,5; 6,5 y 8,5, fue de mayor actividad con éste último, que sugeriría una serin-proteasa. Una banda de 28 kDa y otra de 45 kDa reveló reactividad cruzada entre Pa y Ti. La electroforesis capilar mostró gráficas similares para la Pa, el Ti y sus ninfas, que al superponerse eran coincidentes, lo que ratifica la existencia de epitopes comunes, no necesariamente iguales, expresados tempranamente en el Ti. (Figs. 3 a 15). La Dra. S.G. Irañeta, de nuestro equipo de investigación, en cultivos bacterianos del exoesqueleto de las Pa, identificó diversos gérmenes (cocos y bacilos) Gram positivos y negativos, y en agar Saboureaud, detectó el crecimiento de hongos (*Aspergillus flavus*), cuyo análisis más pormenorizado está llevando a cabo, con lo cual se ratifica su condición de transmisora mecánica de patógenos humanos.

*Figura 3. Pico proteico de Pa por Sephadex G-200.*

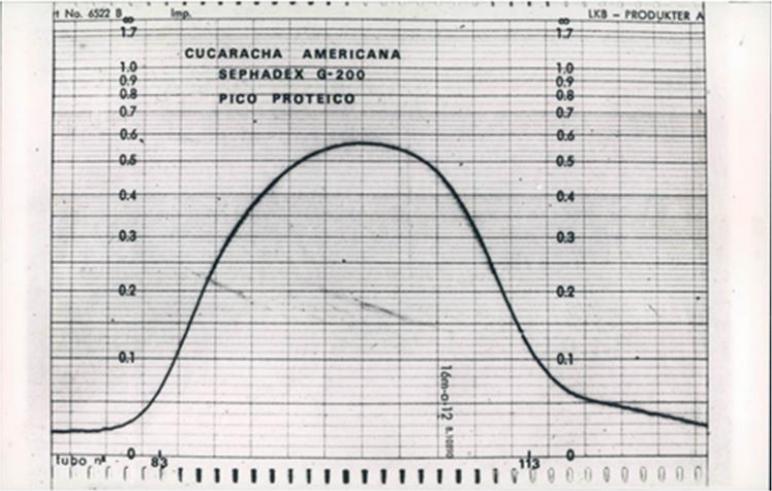
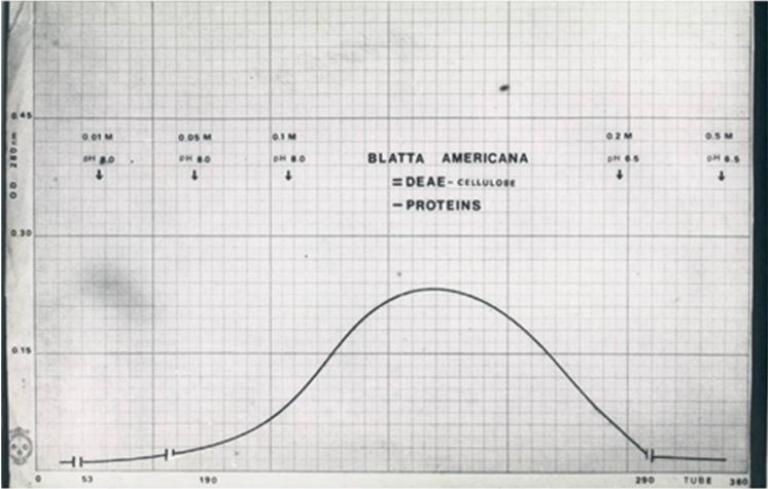


Figura 4. Pico proteico de Pa por DEAE-celulosa.



*Figura 5. Pico hexosas por DEAE-celulosa*

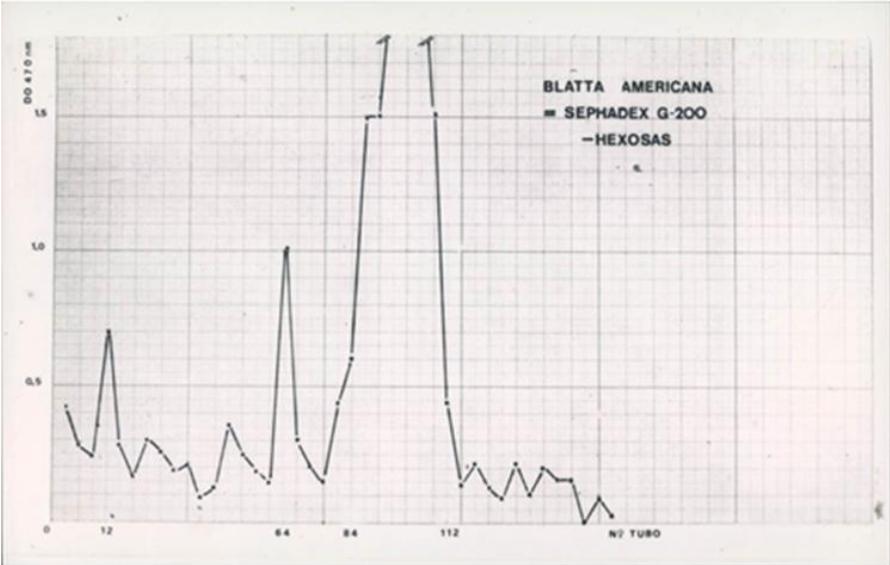
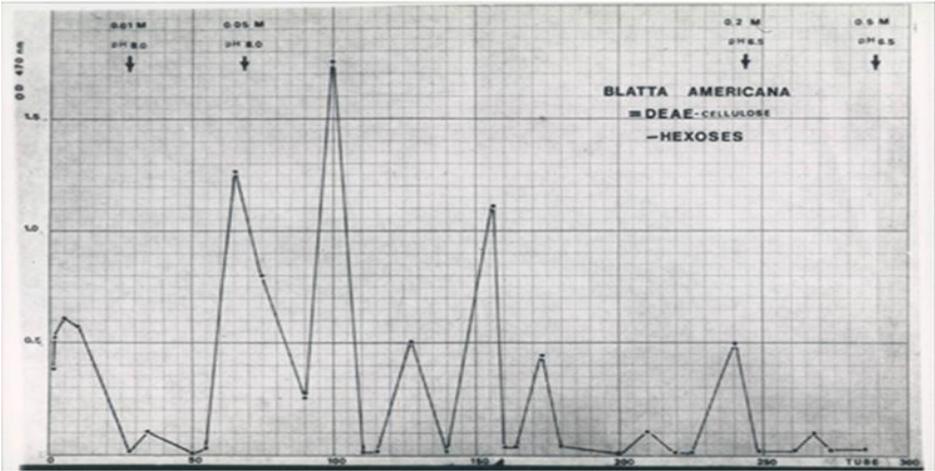
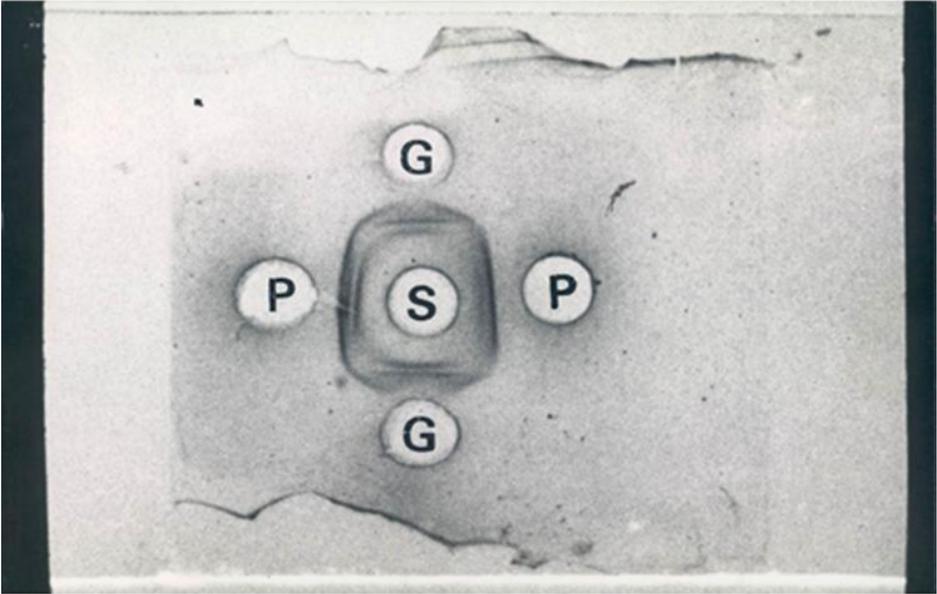


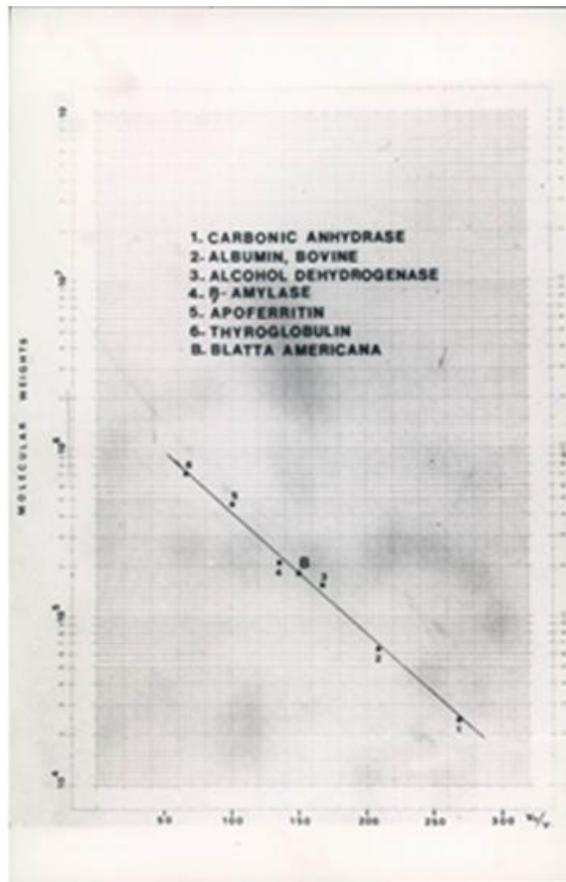
Figura 6. Picos de hexosas por DEAE-celulosa



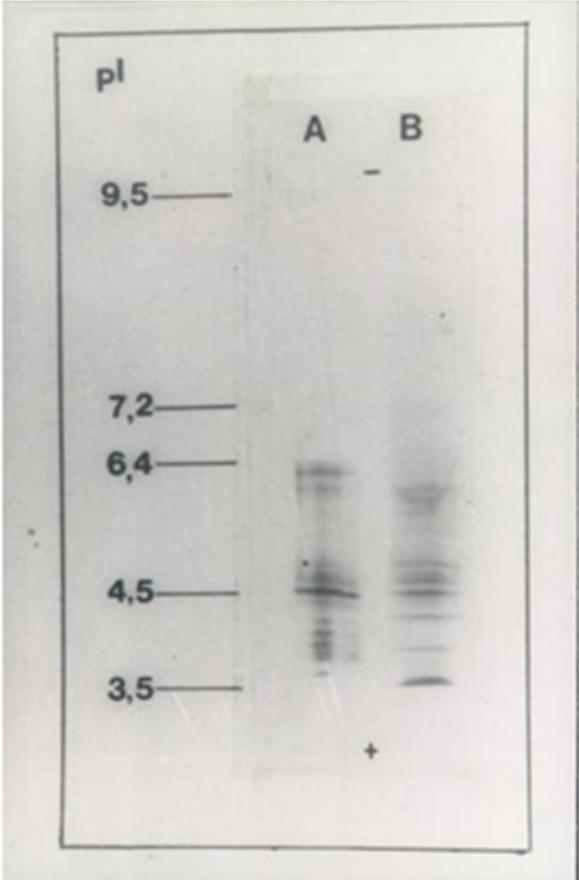
**Figura 7.** Ouchterlony: *P* es *Pa*; *G* es *Blatta germánica*; *S*: suero anti-*Pa*. Hay identidades entre ambos extractos.



*Figura 8. Pesos moleculares de marcadores y de Pa.*

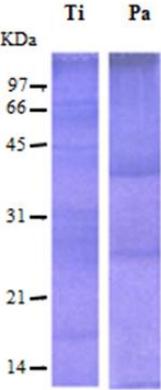


**Figura 9.** Isoelectroenfoco entre Ti (A) y Pa (B). Bandas comunes a igual pl.



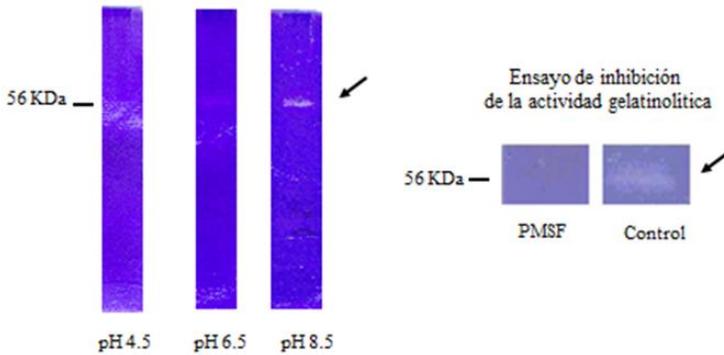
**Figura10.** Bandas similares a iguales kDa: Electroforesis en gel de poliacrilamida de extractos de *Triatoma infestans* (Ti) y *Periplaneta americana* (Pa).

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

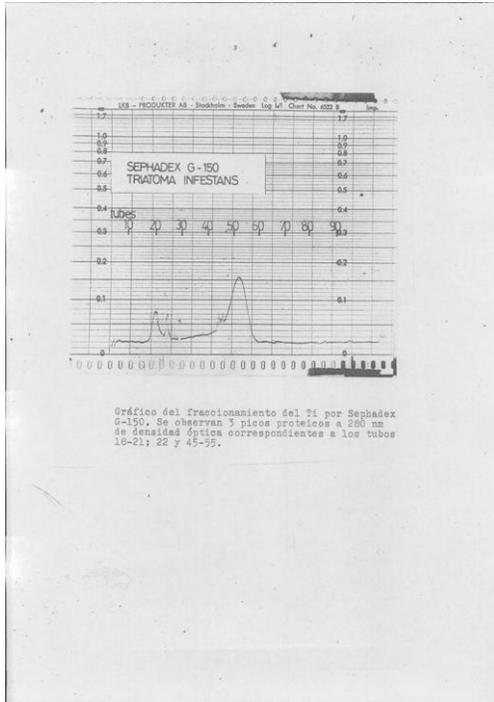


**Figura 11.** Gelatinolisis de la serin-proteasa del *Ti* inhibida por el PMSF. Caracterización de las actividad gelatinolítica del extracto de *Ti*.

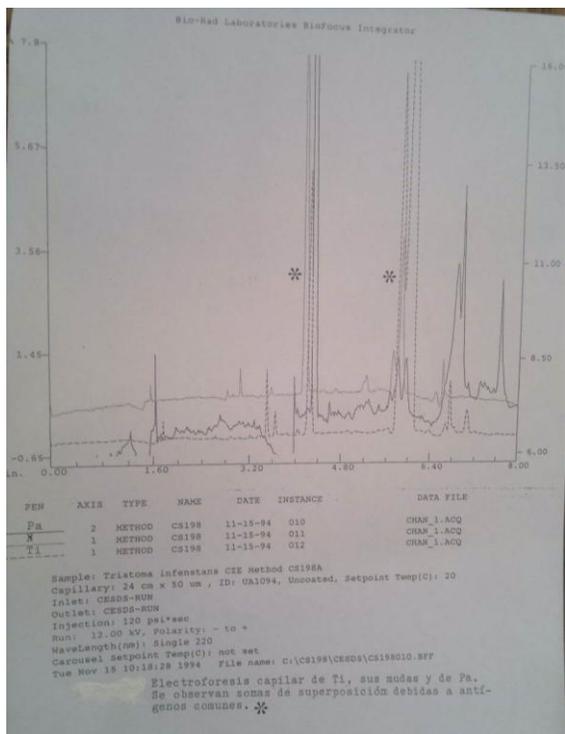
**Caracterización de la actividad gelatinolítica del extracto de *Ti***



**Figura 12.** Picos proteicos del Ti por Sephadex G-150.



**Figura 13. Electroforesis capilar de Pa, Ti y sus estadios ninfales.**



## TABLA 1

	IgE basal KU/L	IgE-RAST-basal anti-Pa. (PRU/mL)	IgE-RAST-anti-Pa después de 3 años. (PRU/mL).
• Pac n°			
• 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 3 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 3 años : x : 1,12 PRU/mL con un DE $\pm$ 0,318 PRU/mL.			p = 0,50





## TABLA 4

- Valores de la IL-4 sérica antes y después de la inmunoterapia.
- Pac. n°:      basal (UI/mL)                                      después de 3 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 3 años : x basal : 327,14 UI/mL con un DE  $\pm$  74 UI/mL;
- x después de 3 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 3 años : 370 UI/mL con un DE  $\pm$  75,16 UI/mL y  $p = 0,50$ .-



***Figura 14. Pulmón de cobayo aerosolizado con Pa.***

---

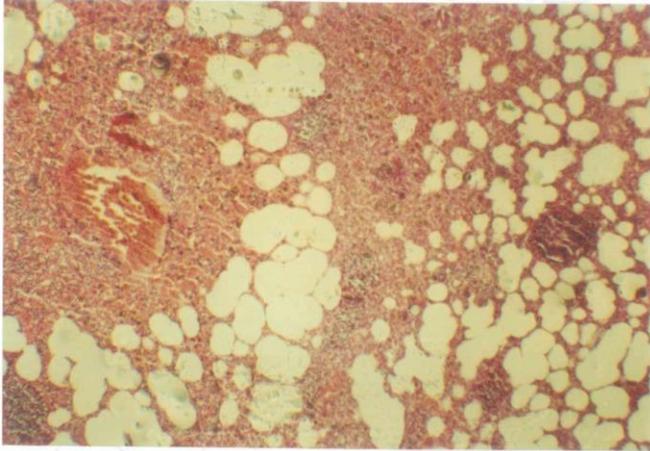


Fig. 7 : Aerosolized guinea-pig lung. Intense infiltrates in the interstitium are observed. HE X100.

**Figura 15. Pulmón de cobayo aerosolizado con Ti.**

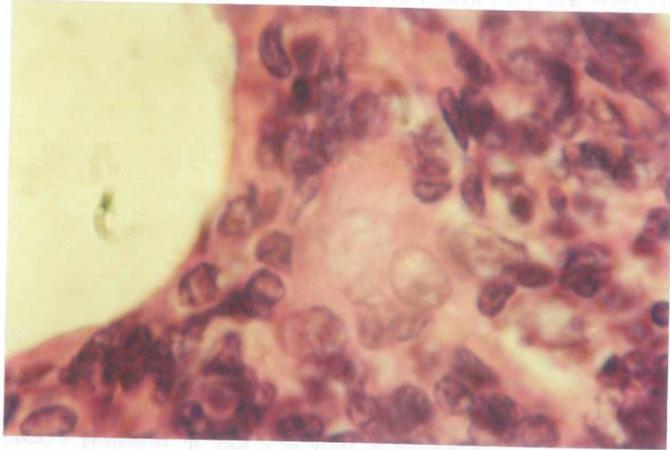


Fig. 8 : Aerosolized guinea-pig lung. Intense interstitial mononuclear and foamy cells infiltrate. HE X400.

**Discusión**

Se exponen los datos obtenidos merced al empleo de técnicas inmunoquímicas e in vivo acerca de la composición biomolecular de los extractos de la Pa y del Ti, originales para nuestro país, y para buena parte de América Latina, por la trascendencia de que ambos insectos comparten epitopes inmunológicamente activos, y, que en este caso, podríamos bautizar como Ti-1 (92 kDa), hasta que más datos fisicoquímicos y su clonación establezcan la nomenclatura respectiva. Merecen destacarse los trabajos de Brenner de la UNLP, que destacó la importancia de las lipoproteínas hemolinfáticas de los insectos (Ti, Pa, la polilla gigante (*Hyalophora cecropia*), la cigarra (*Melarrophis*

differentialis), y la langosta (*Locusta migratoria*), caracterizando HDLp o lipophorin, las VHDL, las VLDL y los NEFA, entre los 78 y 225 kDa. El antígeno utilizado por nosotros podría estar integrado en las lipoproteínas señaladas, no obstante, haber sido nuestro antígeno sometido a un previo proceso de deslipidización, que no debería modificar la estructura proteica que la compone. Además estas proteínas forman un hexámero o hexamerinas (6 subunidades de 70-85 kDa cada una), con gran riqueza de tirosina, fenilalanina y metionina, que podrían justificar las propiedades enzimáticas detectadas en los experimentos. Los insectos emplean sus lípidos como combustible para el comienzo de sus vuelos <sup>(41)</sup>. En América, las cucarachas poseen unas 70 especies y en el mundo unas 2000. El Bla g 1 tiene 7 tándems de 100 aminoácidos cada uno; Bla g 2 (36 kDa) es una aspártico-proteasa del tipo pepsina, catepsina y quimosina; Bla g 4 es una lipocalina; Bla g 5 (23 kDa) es una glutatión-S-transferasa y Bla g 6 (21 kDa) es homóloga de la troponina-C. Por su parte, Pa expresa Per a 1 (25 kDa) con 3 isoformas (1.0101; 1.0103 y 1.0104), Per a 3 (72 kDa) y Per a 7 (33 kDa), cercanos estos últimos a la sumatoria del valor hallado en este estudio. Su importancia epidemiológica no se discute habida cuenta de la relación con enfermedades infecciosas de gran repercusión. Nuestro aporte profundiza ese aspecto al vincular cuadros respiratorios crónicos con la inhalación de proteínas provenientes de los detritos y momificaciones de los insectos adultos y de sus estadios ninfales. Un modelo experimental desarrollado en cobayos con la inhalación crónica de las proteínas de la Pa y del Ti, por separado, y que no se adjuntó a este trabajo por su extensión, demostró la producción de una neumonitis típica con bronquiolitis, infiltrados inflamatorios y granulomas no caseosos, que por su cronicidad podrían ser capaces de inducir una fibrosis pulmonar, considerando que son enzimas proteolíticamente activas (serin-proteasas).<sup>(28-29-30)</sup>. Queda así demostrada la capacidad sensibilizante de ambos insectos, y la reactividad cruzada inmunológica, con lo cual la situación clínica de los asmáticos se complica al cambiar de residencia en el país o en zonas muy expuestas de América Latina. Si la temperatura ambiente se incrementa en 1 ó 2 grados en el futuro, la

pululación de estos insectos será mayor, y la polución que de ellos dependa también empeorando la patología respiratoria (y la infectológica), por lo cual, se deberían disponer mayores estrategias para combatirlos. (“Teoría medio-ambiental de las enfermedades alérgicas”).

## Bibliografía.

- 1- Alonso A., Scavini L.M., Albónico J.F., Mouchián K.:  
"Immunochemical properties of the antigens of *Blatta americana*".  
*Allergol et Immunopathol.*, 1987; 15: 109-115.
- 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: 263-269.
- 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: 100-105.
- 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: 154-159.
- 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: 300-307.
- 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: 19-25.
- 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, p. 57-89.
- 10-Barret A.J. "Classification of peptidases". *Meth.Enzymol.*1994; 244: 1-5.
- 11.-Boyden S.V."The absorption of proteins on erythrocytes

- treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera" *J. Exp. Med.*,1951 ; 93 : 107-114.
- 12- 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: 248-255.
- 13- Ceska M., Erikson R., Varga J.M. "Radioimmunosorbent assay of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*1986; 78: 436-445.
- 14- 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 : 436-439.
- 15- Crowle A. (edit.) "Immunodiffusion" Academic Press, New York, 1961, p. 71-90.
- 16-D'Andrea A. L., Torres Leedham V. M., Castagnino J. M. "Isoelectrofocusing in agarose: clinical applications" *Electrophoresis* 1985; 6: 468-472.
- 17-Dische Z. In: *Methods of Biochemical Analysis*. Vol. 2.Edic. D. Glick, New York, 1955; 200-220.
- 18-Frugoni C. In: *Alergia Clínica*. Hansen K., Werner M., Ed. Salvat, Barcelona, 1970; 586-600.
- 19-Gleich G.J., Larson J.B. "Measurement of potency of allergy extracts by their inhibitory capacities in RAST". *J. Allergy Clin. Immunol.*1974; 58: 113-120.
- 20-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: 235-240
- 21-King C. "The isolation and characterization of a novel collagenolytic serin protease allergen from the dust-mite" *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996; 98: 739-747
- 22-Laemmli U.K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*, 1970; 277: 680-688.
- 23-Ouchterlony O. "Diffusion in gel methods for immunological analysis".*Progr. Allergy*, 1958; 5:1-9.
- 24-Reinhart M.P., Malamud D. "Protein transfer of

electrofocusing gels: the native blot". *Anal.Biochem.*, 1982; 123: 229-238.

25-Rohr A.S., Marshal N.A., Saxon A. "Successful immunotherapy for *Triatoma protracta* induced anaphylaxis". *J. Allergy Clin. Immunol.*1984; 73: 369-371.

26-Towbin H., Gordon. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979; 9: 4350-4355.

27-Voorhost R., Spieskma F. "Is a mite (*Dermatophagoides spp*) the producer of the house dust allergen?". *Allergy Asthma*, 1964; 10: 329-333.

28-Alonso A., Potenza M., Rodríguez S.R. : "Las proteasas de los insectos como inductoras de hipersensibilidad en los humanos," *Anales de la Sociedad Científica Argentina*, 2003; 232: 23-39.

29-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.

30-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.

31.-Bernton H. : Cockroach asthma. *Brit. J. Dis. Chest.*, 1972; 66 : 611-615.

32.-Chang J.L. : Comparison of diagnostic tests for cockroach sensitivity among asthmatics. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1984 (Abst.), 73 : 153.

33.- Kang B. : Study on cockroach antigen as a probable causative agent in bronchial asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1976 ; 58 : 357-366.

34.- Kang B. : A comparative study of prevalence of skin hypersensitivity to cockroach and house-dust-antigens. *Ann. Allergy*, 1978 ; 41 : 333-338.

35.- Kang B : Cockroach cause of allergic asthma. *J. Allergy Clin.Immunol.*,1979; 63 : 80-88.

36.- Khan A.H. : Comparison of allergenicity of whole body and body parts of german and American cockroach. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1984; 73 : 144-150.

37.- Richman P. : The important sources of german cockroach allergens as determined by RAST analysis. *J. Allergy Clin.*

Immunol., 1984; 73 : 590-598.

38.- Fernández M., Martínez D., Tantaleán M. : Parásitos presentes en *Periplaneta americana* Linnaeus “Cucaracha doméstica” de la ciudad de Ica. *Rev. Per. Biol.*, 2001; 8: (2) : 1-7.

39.- Baena Cagnani, C.E., Fernández A., Patiño C.M., Salvucci K. : Reactividad cutánea a *Periplaneta americana* y *Blattella germanica* en pacientes asmáticos. *Arch. arg. alerg. inmunol. clin.*, 1993; 24 (4): 180-185.

40.- Albónico J.F. : “Propiedades inmunoquímicas de las fracciones solubles de la *Periplaneta americana*”.- Tesis de Doctorado.- *Bibliot. Fac. Med.*, 1984.-

41.- Brenner R.: Las lipoproteínas hemolinfáticas de insectos. *Anales de la Sociedad Científica Argentina*, 1997 ; 227 : 139-155.

**Nota al pie** : Doctor en Medicina.- Profesor Emérito de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la UBA.- Ex Presidente de la Sociedad Científica Argentina.- E-mail: [porota1913-2015@hotmail.com](mailto:porota1913-2015@hotmail.com) ; o [alehclin@fmed.uba.ar](mailto:alehclin@fmed.uba.ar)