

Cucarachas y vinchucas en patología general y respiratoria

Dres Ángel Alonso, Julio F Albónico, Krikor Mouchián, Santiago R Rodríguez, Silvia G Irañeta, Carlos H Pionetti

División Alergia, Hospital de Clínicas, 2^{da} Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA.

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.

Palabras claves. Cucarachas, vinchucas, serin-proteasas, antigenicidad cruzada, enfermedad respiratoria.

Summary

Data concerning the cross-reactivity between the serin-proteases of the cockroach *Periplaneta Americana* and the reduviid *Triatoma infestans* 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.

Key words. Cockroaches, kissing-bugs, serin-proteases, cross-reactivity, 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 África 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 erradi-

car conjuntamente con *Blattaorientalis* 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 fotofobia, 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 sucias o descartadas. 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*, *Pseudomonas 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*, *Entamoeba histolytica* y *coli*, *Giardia lamblia*, *Hymenolepis nana* y *diminuta*, *Necator americano*, *Trichuris trichura*, *Lophomonas blattarum*, *Leptomonas ssp*, *Leidyneema appendiculatum*, *Hammerschmidtella diesingi*, *Blastocytis hominis*, *Cryptosporidium sp* e *Iodamoeba bütschilli*. Hongos como *Aspergillus fumigatus* y *niger* también contaminan sus heces y patas.³⁸

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 (sín-

Correspondencia. Dr Ángel Alonso
E-mail: alehclin@fmed.uba.ar

drome 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.²⁷ 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.³¹⁻³⁷ 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.⁴⁰ 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.⁹ 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, chinchas 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, oquedades 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*, *eratyrisiforme* y *spinolai*).²⁵ 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, los cuales 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 (Figuras 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.¹⁻⁷

Figura 1. *Periplaneta americana*.

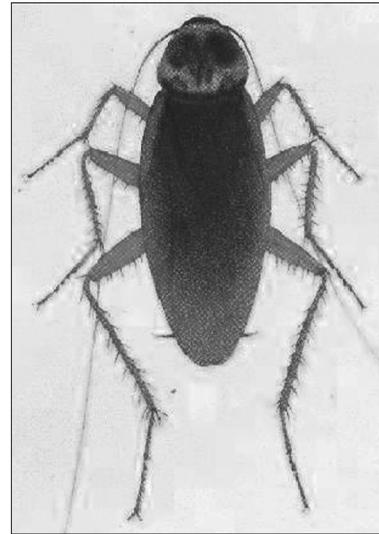


Figura 2. *Triatoma infestans*



Materiales y métodos

1. **Antígenos:** extractos del cuerpo entero de Pa y de Ti se prepararon según las pautas descritas 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°C.¹⁸

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 *bufferes* de fosfato 0,15 M ClNa, pH 8 a 4°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 Bradford¹² 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 inmunoelectroforesis.^{11, 15, 23}

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 ≥ 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 cumplimentaron 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 ≥ 5 mm. Los pacientes no habían ingerido ningún fármaco que interfiriera la reacción cutánea.¹⁻³⁹

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.⁸⁻¹³⁻¹⁹

8. **SDS-PAGE y Western-blots:** 20 mcl de Pa y de Ti se sembraron en geles de poli(acrilamida 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.²²⁻²⁴⁻²⁶

9. **Ensayos de actividad enzimática:** minigeles de 10 x 10 cm c/u de poli(acrilamida 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%, incu-

bados 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.¹⁰⁻¹⁷⁻²⁰

10. **Electroforesis capilar:** se desarrolló en *Bio-Rad* (Hércules, California, EE.UU.) 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.

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 2.000 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 1/1.024 en el Boyden; el Ti detectó anticuerpos específicos 1/4.096 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. El SDS-PAGE reveló 13 bandas proteicas que al ser marcadas con I¹²⁵ 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. (Figuras 3 a 15). La Dra SG Irañeta, 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, 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 columna de Sephadex G - 200.

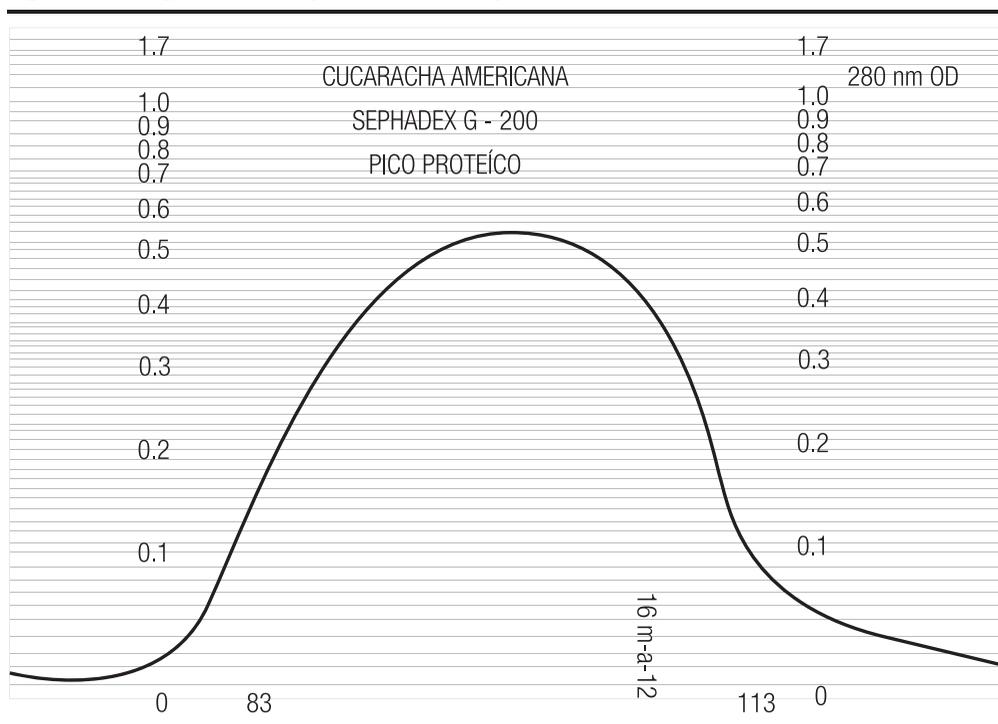


Figura 4. Pico proteico de Pa por DEAE-celulosa.

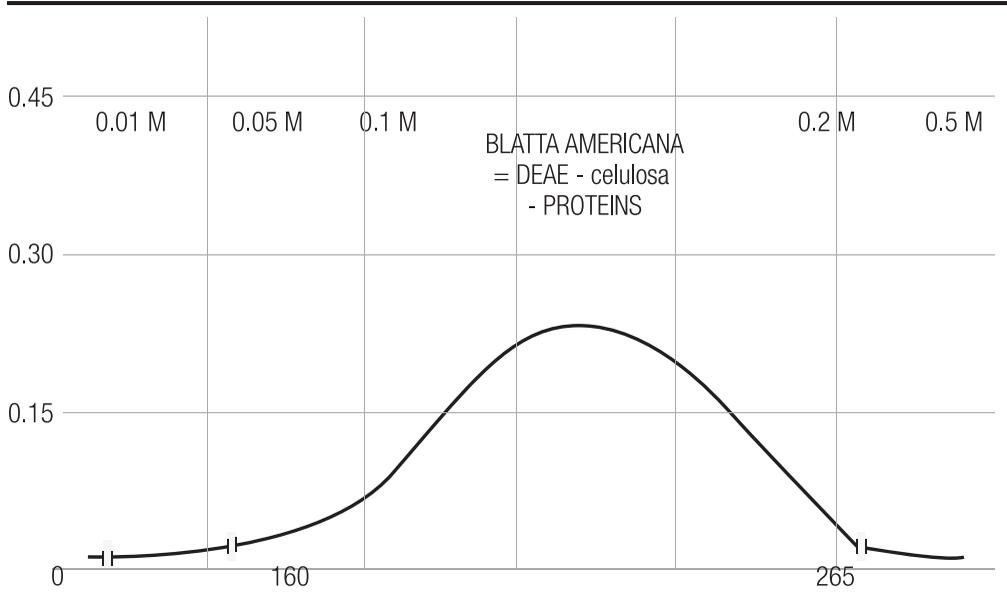


Figura 5. Picos de hexosas de Pa por Sephadex G-200.

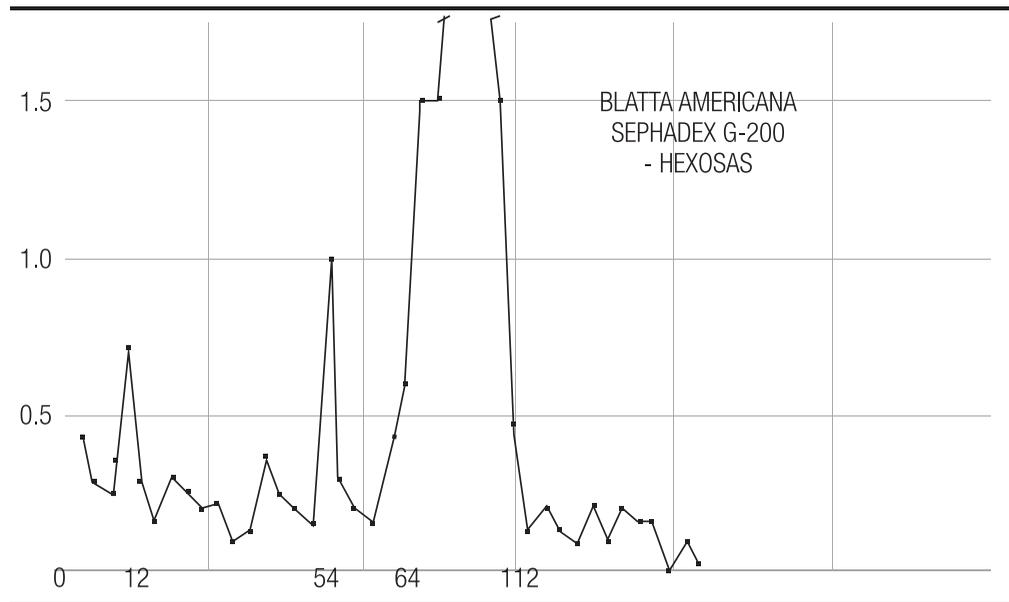


Figura 6. Picos de hexosas por DEAE-celulosa.

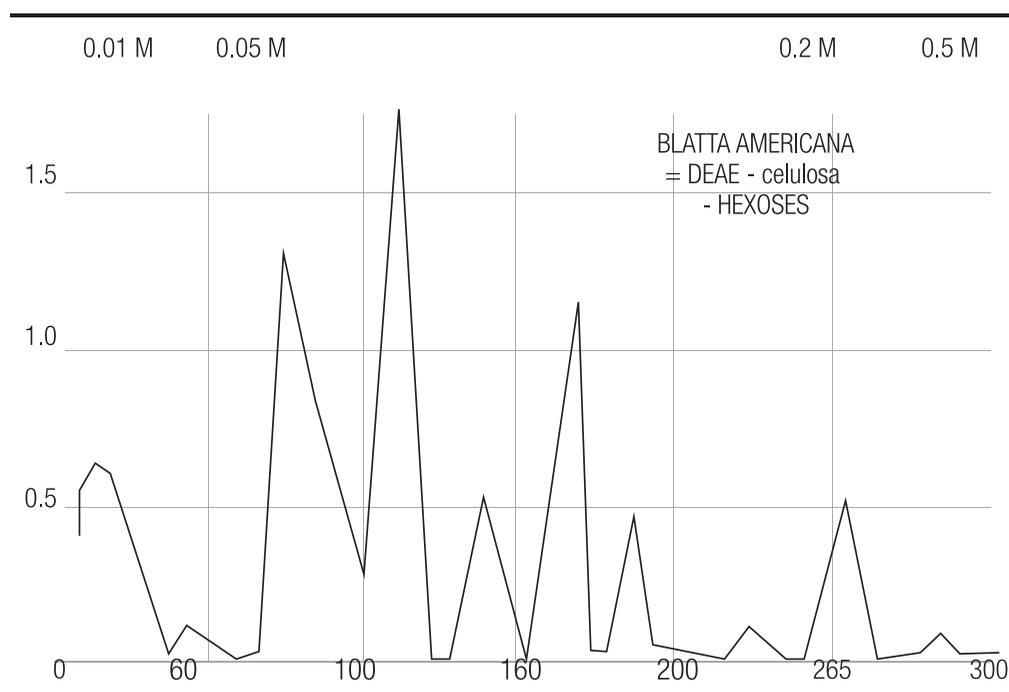


Figura 7. Ouchterlony: P es Pa; G es *Blatta germánica*; S: suero-anti-Pa. Hay identidades entre ambos extractos.

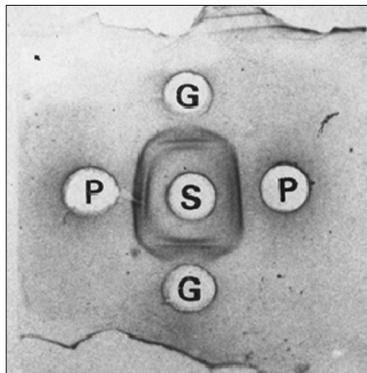


Figura 8. Pesos moleculares de marcadores y de Pa.

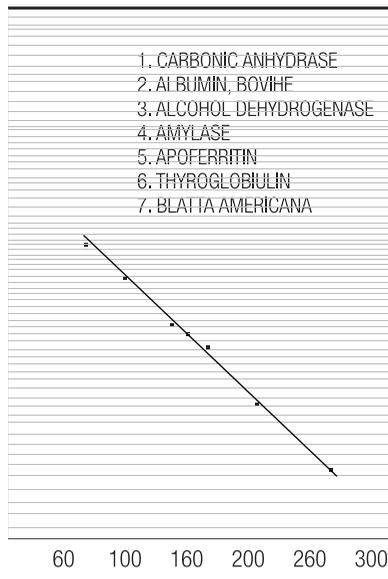


Figura 9. Isoelectroenfoque entre Ti (A) y Pa (B). Bandas comunes a igual pI.

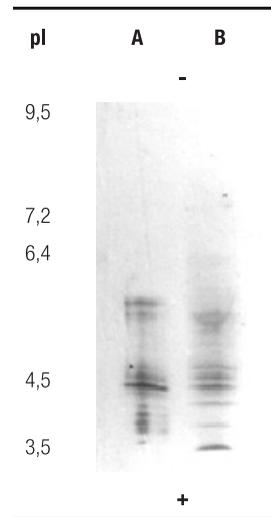


Figura 10. Bandas similares a iguales kDa: Electroforesis en gel de poliacrilamida de extractos de *Triatoma infestans* (Ti) y *Periplaneta americana* (Pa).

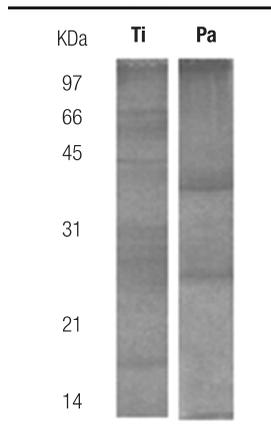


Figura 11. Gelatinolisis de la serin-proteasa del Ti inhibida por el PMSF. Caracterización de la actividad gelatinolítica del extracto de Ti.

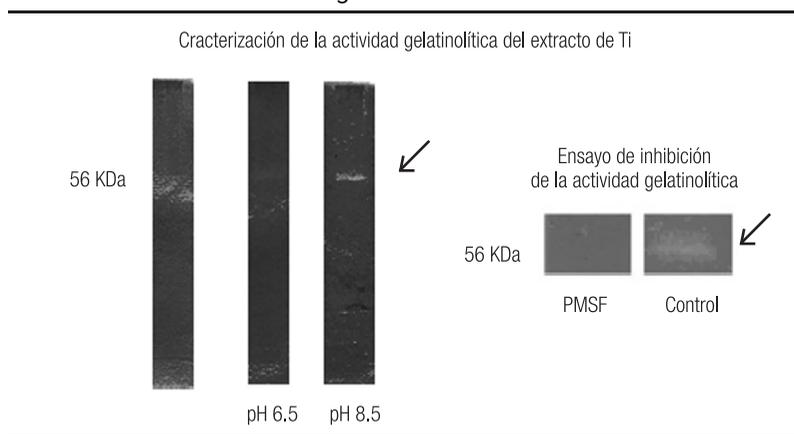


Figura 12. Bandas detectadas por 2 antisueros diferentes. Ensayos de reactividad cruzada entre los extractos de *Triatoma infestans* (Ti) y *Periplaneta americana* (Pa).

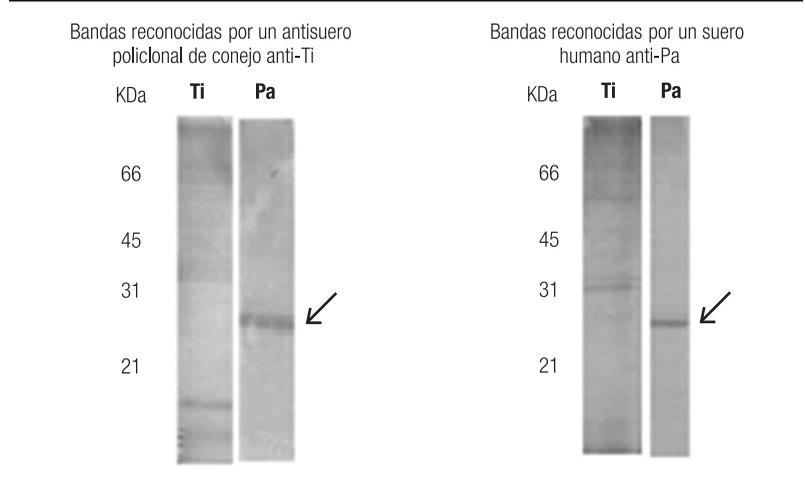


Figura 13. Electroforesis en gel de policrilamida y western blot de un extracto de *Triatoma infestans* (Ti).

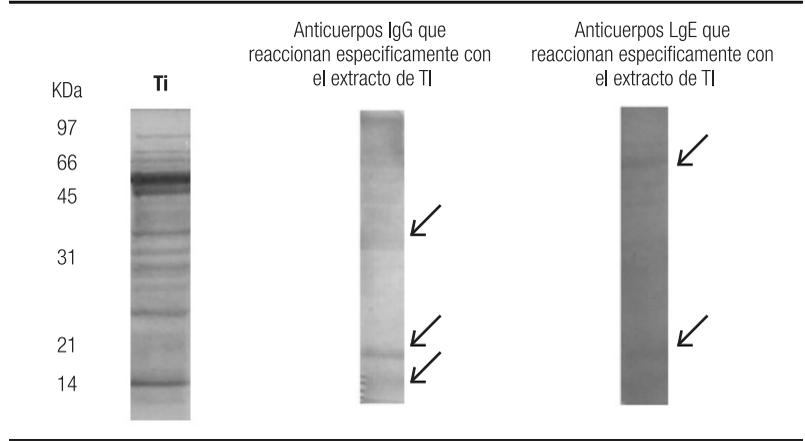


Figura 14. Gráfico del fraccionamiento del Ti por Sephadex G-150. Se observan 3 picos proteícos a 280 nm de densidad óptica correspondientes a los tubos 18-21; 22 y 45-55.

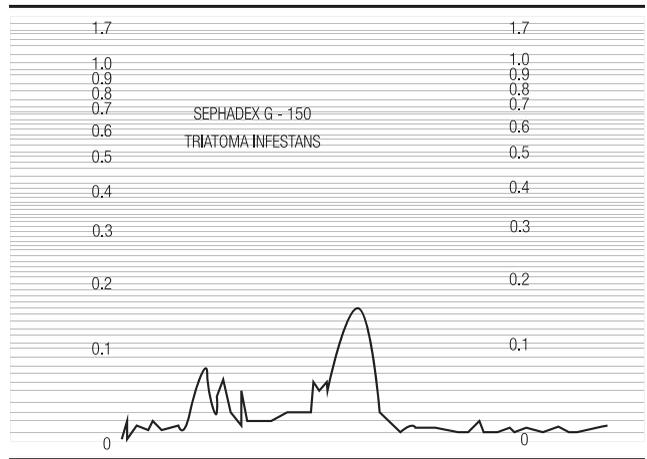
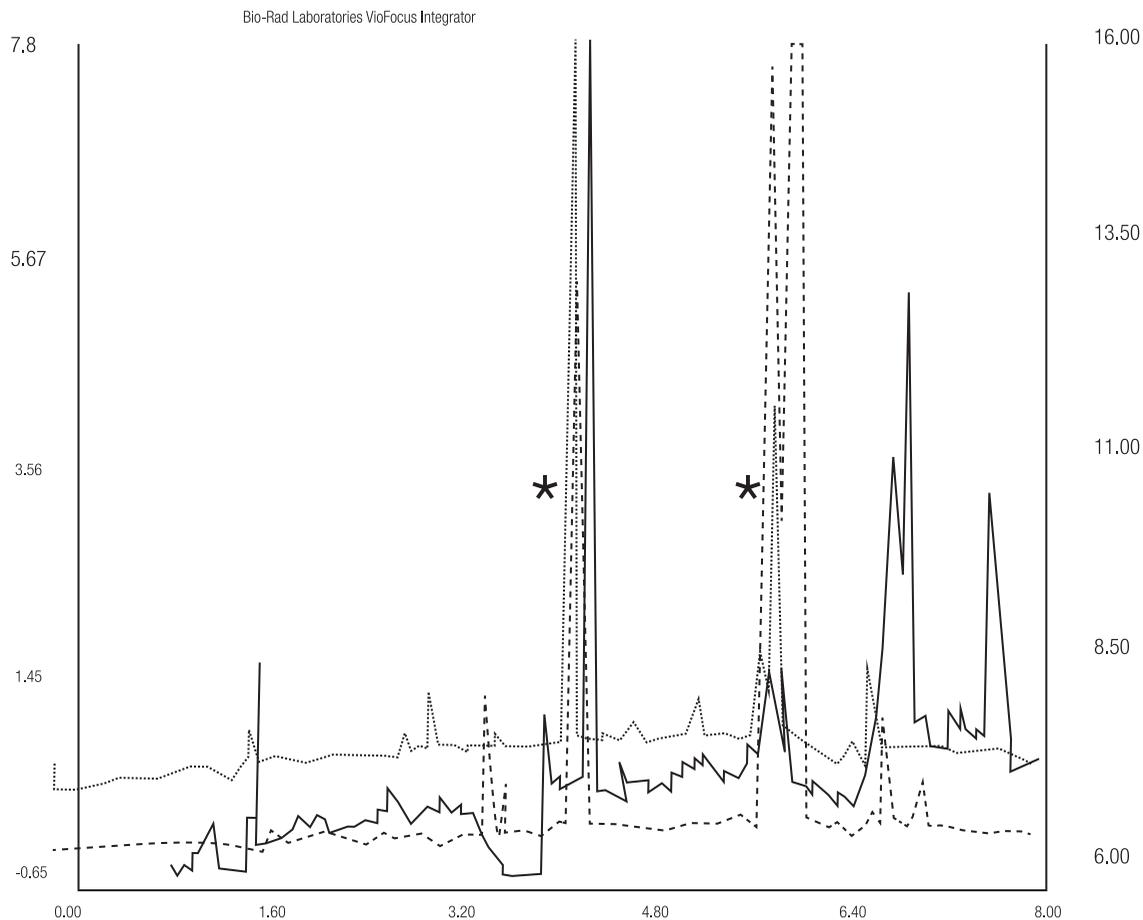


Figura 15. Gráfico del fraccionamiento del Ti por Sephadex G-150. Se observan 3 picos proteícos a 280 nm de densidad óptica correspondientes a los tubos 18-21; 22 y 45-55.*



PEN	AXIS	TYPE	NAME	DATE	INSTANCE	DATA FILE
Pa	2	METHOD	CS198	11-15-94	010	CHAN-1.ACQ
N	2	METHOD	CS198	11-15-94	011	CHAN-1.ACQ
Ti	2	METHOD	CS198	11-15-94	012	CHAN-1.ACQ

Sample: Triatoma infestans CZE Method cs198A
 Capillary: 24 cm x 50 um, ID: UA1094, Uncoated, Setpoint Temp (c): 20
 Inlet: CESDS-RUN
 Outlet: CESDS-RUN
 Injection: 120 psi*sec
 Run: 12.00 kV, Polarity: - to +
 WavLength (nm): Single 220
 Carousel Setpoint temp (c): not set
 Tue Nov 15 10:18:28 1994 File name: C:/cs198/CESDS/cs198010.BFF

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 producto de que ambos insectos comparten epito-

pes 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.⁴¹ En América las cucarachas poseen unas 70 especies y en el mundo unas 2.000. 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).²⁸⁻²⁹⁻³⁰ 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

- Alonso A., Scavini L.M., Albónico J.F., Mouchián K.: "Immunochemical properties of the antigens of Blatta americana". *Allergolett Immunopathol*, 1987; 15: 109-115.
- Alonso A, Albónico JF, Belloti M, Mouchián K, Pionetti CH. "Interstitial pneumonitis induced in guinea-pigs by the antigens of Periplaneta americana". *J Invest Allergol Clin Immunol*, 1992; 2: 263-269.
- Alonso A, Albónico JF, Mouchián K, Belloti M, Pionetti CH. "Producción de anticuerpos IgE-anti-Periplaneta americana en cobayos por vía inhalatoria." *Prensa Med Argent*. 1993; 80: 100-105.
- Alonso A., Albónico JF, Isola ED, Scavini LN, Mouchián K. "Cross reactivity between antigens of Blatta americana and Triatoma infestans." XIII International Congress of Allergology and Clinical Immunology, Montreaux (Suiza), 1998.
- Alonso A, Marino GA, Scavini LM, Rodríguez SM. "Immunochemical properties of the antigens of Triatoma infestans". *J Invest Allergol Clin Immunol* 1992; 2: 154-159
- Alonso A, Marino GA, Scavini LM, Rodríguez SM. "Anticuerpos IgE-anti-Triatoma infestans en humanos atópicos y no-atópicos". *Prensa Méd. Argent*. 1994; 81: 300-307.
- 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.
- Anderson MC. "Methodology for RAST-inhibition". In: *Methods of the allergenic products*. FDA. Bethesda 1986; 1-17.
- Atías A, Neghme A. "Parasitología clínica." Edit Mediterráneo. Santiago de Chile. 1993.
- Barret AJ, "Classification of peptidases". *Meth. Enzymol*. 1994; 244: 1-5.
- Boyden S.V. "The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiproteinase". *J Exp Med*, 1951; 93: 107-114.
- Bradford MM. 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.
- Ceska M, Erikson R, Varga JM. "Radioimmunosorbent assay of allergens. *J. Allergy Clin Immunol*. 1986; 78: 436-445.
- Chapman MD, Marshal NA, Saxon A. "Identification and partial purification of species specific allergens from Triatoma protracta". *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78: 436-439.
- Crowle A (edit). "Immunodiffusion". Academic Press, New York, 1961.
- D'Andrea AL, Torres Leedham VM, Castagnino JM. "Isoelectrofocusing in agarose: clinical applications". *Electrophoresis* 1985; 6: 468-472.
- Dische Z. In: *Methods of Biochemical Analysis*. Vol. 2. Edic. D. Glick, New York, 1955; 200-220.
- Frugoni C. In: *Alergia Clínica*. Hansen K, Werner M, Ed Salvat, Barcelona, 1970; 586.
- Gleich GJ, Larson JB "Measurement of potency of allergy extracts by their inhibitory capacities in RAST". *J Allergy Clin Immunol*. 1974; 58: 113-120.
- Irañeta SG, Duschak V, Seoane MA, Alonso A. "Proteinase and gelatinolytic activities of house dust mite and cockroach extracts". *J Invest Allergol Clin Immunol*. 1999; 9: 235-240.
- 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.
- Laemli UK. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*, 1970; 227: 680-688.
- Ouchterlony O. "Diffusion in gel methods for immunological analysis". *Progr Allergy*, 1958; 5:1-9.
- Reinhart MP, Malamud D. "Protein transfer from isoelectrofocusing gels: the native blot". *Anal Biochem*, 1982; 123: 229-238.

25. Rohr AS, Marshal NA, 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 SR. "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. Bernnton H. Cockroach asthma. *Brit J Dis Chest.* 1972; 66 : 611-615.
32. Chang JL. 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 agente 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 AH. 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 importante 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, CE, Fernández A, Patiño CM, Salvucci K. Reactividad cutánea a *Periplaneta americana* y *Blattella germanica* em pacientes asmáticos. *Arch arg alerg immunol clin.* 1993; 24 (4): 180-185.
40. Albónico JF. "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.