

ANALISIS ELECTROFORETICO DE EXTRACTOS DE PERIPLANETA AUSTRALASIAE Y P. AMERICANA

Olger Calderón A* y Mayra Solano Ch*

Key Words: Electrophoresis - SDS PAGE - Allergy - Cockroaches - *Periplaneta australasiae* - *Periplaneta americana*

RESUMEN

Se prepararon extractos proteicos de todo el cuerpo de cucarachas *Periplaneta americana* y *Periplaneta australasiae* (Dictyoptera:Blattidae). Las proteínas correspondientes fueron separadas e identificadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Los perfiles proteicos fueron analizados, encontrándose numerosas bandas compartidas y no compartidas en los extractos de cada especie. Lo anterior podría ser la causa de la reactividad cruzada e individual a estas cucarachas mostrada por pruebas cutáneas en pacientes alérgicos a estos extractos. (Rev. Cost. 'Cienc. Méd. 1994; 13(3, 4): 37-41).

INTRODUCCION

Las cucarachas domésticas son insectos que por su estrecha relación con el hombre, así como por su abundante tasa de multiplicación en las viviendas humanas, han sido implicadas como fuentes potenciales de alérgenos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10).

Se ha visto que la presencia de partículas provenientes de cucarachas (heces, vómitos, detritos o fragmentos de exoesqueleto) en polvo casero cooperan en la alergenicidad del mismo (1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13). Recientemente se ha podido valorar el papel que las cucarachas *Periplaneta australasiae* y *Periplaneta americana* desempeñan como potenciales fuentes de alérgenos en pacientes alérgicos de Costa Rica (14, 15). Según los resultados obtenidos mediante pruebas cutáneas (Skin Prick Test) se puede suponer que ambas especies comparten los principales alérgenos (14, 15).

En este trabajo se compara la identidad proteica de los extractos crudos de estas cucarachas para establecer similitudes y diferencias en las proteínas extraídas de cada especie y relacionarlas con alérgenos que ya han sido identificados (9, 16, 17, 18).

MATERIALES Y METODOS

Se prepararon extractos crudos de todo el cuerpo de las especies de cucarachas *Periplaneta australasiae* y *Periplaneta americana* de acuerdo al método de Mendoza & Snyder (12). La cantidad de proteína de cada extracto fue determinada mediante el método de Bradford (19) y ajustada a una concentración de 1 ug/uL.

Se determinó el patrón de migración electroforética de los extractos en geles de poliacrilamida (SDS PAGE) al 12%, usando el sistema de buffer discontinuo de Laemmli (20) en una cámara de electroforesis modelo PROTEAN II (BIO RAD).

* Centro de Investigación y Diagnóstico en Parasitología (CIDPA). Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica.

Las muestras se trabajaron por triplicado y se les adicionó beta mercaptoetanol hasta una concentración final de 5%. A cada muestra se le agregó azul de bromofenol para indicar el frente de migración en la corrida electroforética. Cada muestra fue colocada en agua a ebullición por un espacio de cinco minutos antes de cargar en la cámara de electroforesis. En cada pozo del gel se colocaron 40 ug de proteína (50 uL de la muestra tratada). Posteriormente se aplicó una corriente eléctrica de 25 mA para el gel espaciador y de 35 mA para el gel separador, dada por una fuente de poder BIO RAD modelo 1000/500 por un período de 5 horas. Se utilizaron como marcadores de peso molecular las siguientes proteínas: albúmina bovina (PM: 68 000 D), cadena pesada de IgG (PM: 53 000 D), ovalbúmina (PM: 43000 D) mioglobina (PM: 17.200 D) y lysosima (PM: 14.300 D).

Una vez finalizada la corrida electroforética, el gel se colocó en una solución fijadora de metanol al 50% por un período de 1 hora. Luego se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250 (BIO RAD) por un período de 30 minutos y se decoloró con una solución de metanol al 20% etanol al 10% y ácido acético al 5%. Para esto el gel se sometió a pasajes de 30 minutos en esta solución hasta que las bandas fueron visibles. Los geles fueron fotografiados y conservados en ácido acético al 7%. Los pesos moleculares de las bandas fueron determinados de acuerdo al sistema de Weber & Osborn (21).

RESULTADOS

Los patrones de migración electroforética observados en los extractos de ambas especies fueron similares.

Con los extractos de *Periplaneta americana* se encontraron 24 proteínas localizadas en un ámbito de peso molecular de 13,8 a 158 kDa, de las cuales doce fueron aparentemente especie específica. Con los extractos de *Periplaneta australasiae*, se identificaron 20 bandas, las cuales migraron en un intervalo de peso molecular de 14,5 a

158 kDa. Ocho de ellas se encontraron sólo en los extractos de esta cucaracha. 12 bandas proteicas fueron compartidas por ambas especies. (Cuadro 1).

DISCUSION

De acuerdo al análisis electroforético de los extractos, se pudo notar que muchas de las proteínas presentes aparentemente son compartidas por ambas especies. Este dato asociado a la alta reactividad cruzada encontrada en pacientes alérgicos severos mediante pruebas epicutáneas (Prick-Test) permiten suponer que la mayoría de los alérgenos presentes en estas dos especies de cucarachas domiciliarias pueden ser compartidos (14, 15).

Diversos grupos han trabajado en la identificación de los principales alérgenos provenientes de extractos proteicos de cucarachas. Twarog y Colaboradores (9) lograron determinar la presencia de tres antígenos importantes en extractos de *Periplaneta americana*: un CR-I (PM:25 000 D) capaz de inducir una respuesta positiva en el 70% de pacientes alérgicos sensibles al extracto crudo. También encontraron un segundo alérgeno CR-II (PM 63.000 -65 000) con propiedades similares al segundo y un GR-hI (PM: 10.000 D) que produjo una respuesta sólo en el 30% de los pacientes sensibles al extracto crudo. Schou y colaboradores (16) encontraron un alérgeno de *Periplaneta americana* denominado Per a 1 (PM: 25.000) que podría corresponder al CR-I de Twarog. En el presente trabajo se identificó una proteína de PM 25.000 D, tanto en extractos de *Periplaneta americana* como en los de *Periplaneta australasiae* (Figura 1), que podría corresponder al alérgeno citado anteriormente. Con esta metodología no se pudo encontrar proteínas de PM: 63.000 -65.000 D, ni 10.000 D.

Wu y Lan (17) identificaron nueve componentes alérgicos en extractos de *Periplaneta americana* de pesos moleculares 120.000, 110.000, 90.000, 78 000, 72.000, 49.000, 45.000, 29.000 y 26.000 D. En este estudio no se encontró

CUADRO No. 1

**BANDAS PROTEICAS INDIVIDUALES Y COMPARTIDAS EN
EXTRACTOS DE TODO EL CUERPO DE *PERIPLANETA*
AUSTRALASIAE Y *P. AMERICANA***

EXTRACTO	<i>PERIPLANETA AMERICANA</i>		<i>PERIPLANETA AUSTRALASIAE</i>	
	Nº	PM (kDa)	Nº	PM (kDa)
Bandas Individuales	12	112-100-76-59 54-53-49-47- 18-17, 88-15,3- 13,8	8	48-45-39,8- 38-37-32,3- 31,5-17
Bandas Compartidas	12	158-89-72-71 50-45,5-31,5 29-27-25-16,2 14,5	12	158-89-72-71 50-45, 5-31,5 29-27-25-16,2 14,5
Total de Bandas	24		20	

para esta especie ninguna proteína de peso molecular similar a 120 000 D; sin embargo sí se encontraron proteínas de pesos moleculares similares a las restantes: 112.000, 89.000, 76.000, 72.000, 47.000, 45.000, 29.000, 25.000-27.000 D. De éstas, las proteínas de PM 89.000, 72.000, 45.000, 29.000, 25.000 y 27.000 D, son aparentemente compartidas con *Periplaneta australasiae*. Para Wu y Lan (17) las fracciones más importantes parecen ser las de PM 78.000 y 72.000 D. Si la proteína de 72.000 D que se identificó en este trabajo corresponde a la proteína citada por Wu y Lan, ésta podría ser una de las proteínas que inducen reacción cruzada a extractos de ambas especies por parte de pacientes alérgicos severos (Figura 1). Kang y colaboradores (18) fraccionaron extractos crudos de cucarachas y encontraron que la fracción que contenía los principales alérgenos agrupaba a proteínas de PM 41-116 kDa. En nuestro trabajo se encontraron cinco proteínas compartidas por ambas especies en este ámbito de peso

molecular, lo que ayuda a suponer una vez más, que si estas proteínas tienen actividad alérgica, ambas especies presentan alérgenos comunes.

Otras proteínas se encontraron sólo en uno de los dos extractos (Cuadro 1), lo que podría explicar la reactividad individual advertida en algunos pacientes alérgicos severos al ser confrontados con extractos de ambas cucarachas en pruebas cutáneas de Pricktest (14,15).

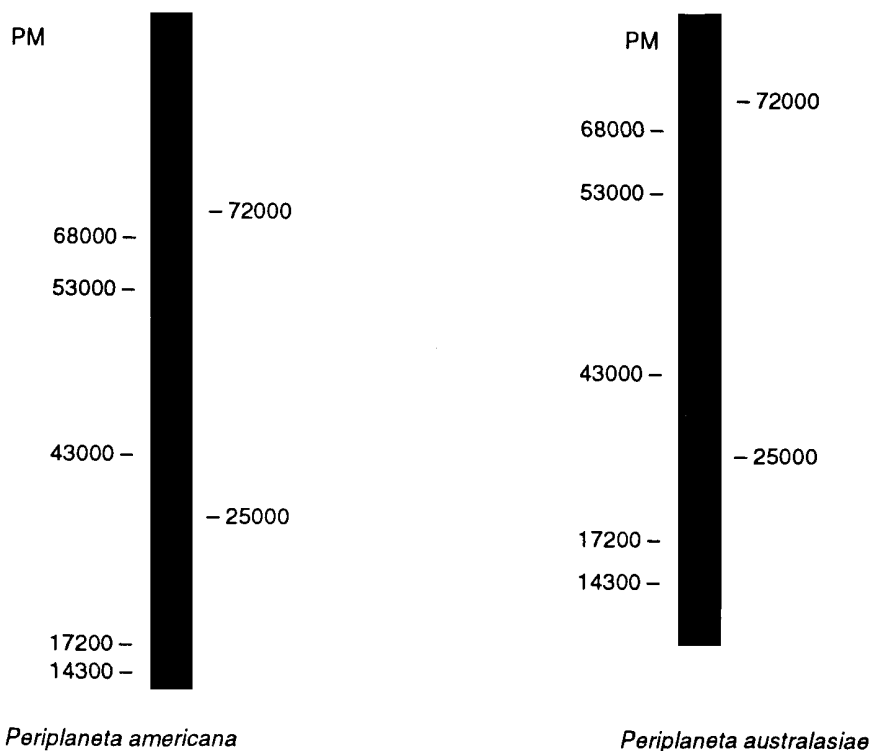
Queda pendiente analizar las propiedades alérgicas de cada proteína identificada con el fin de poder utilizarlas tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de las alergias.

ABSTRACT

Whole body protein extracts of cockroaches *Periplaneta americana* and *Periplaneta australasiae* were performed. Proteins were

FIGURA 1

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON DUODECIL SULFATO DE SODIO (SDS-PAGE) DE EXTRACTOS PROTEICOS DE CUCARACHAS



separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE). Protein profiles for each extract were done. Many shared and unshared bands were found in both extracts. These proteins could be the cause of individual and cross reactivity in allergic patients.

AGRADECIMIENTO

A los Doctores Mario Vargas, Francisco Hernández y Claudio Sánchez de la Facultad de Microbiología en la Universidad de Costa Rica, por la lectura y observaciones a este manuscrito.

A la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por su apoyo económico al proyecto VI 803-089-073.

REFERENCIAS

1. Bernton, H. S & Brown, H. Insect allergy. Preliminary studies of the cockroach. *J. of Allergy*. 1964; 35: 506-513.
2. Bernton, H. S. & Brown, H. Cockroach allergy II. The relation of infestation to sensitization. *South Med. J.* 1967; 60: 852-855.
3. Bernton, H. S. & Brown, H. Cockroach allergy: Age of onset skin reactivity. *Ann Allergy*. 1970; 28: 420-422.

4. Bernton, H. S. & Brown, H. Insect Allergy: The allergenicity of the excrement of the cockroach. *Ann allergy*. 1970; 28: 543-547.
5. Kang, B. Specificity of Cockroach antigen as causative agent in bronchial asthma. *J allergy Clin. Immunol*. 1976; 57:237-238.
6. Kang, B. Study on Cockroach antigen as probable causative agent in bronchial asthma. *J. allergy Clin. Immunol*. 1976; 58: 357-365.
7. Kang, B. & Suilt, N. A comparative study of prevalence of skin hypersensitivity to cockroach and house dust antigens. *Ann Allergy*. 1978; 41:333-336.
8. Schulaner, F. A. Sensitivity of cockroach in three groups of allergic children. *Pediatrics*. 1970; 45: 465-466.
9. Twarog, F. J.; Picone, F. J. Strunk, R. S, So, J. & Colten, H. Immediate hypersensitivity to cockroach. *J. allergy Clin. Immunol*. 1979; 69(2): 154-160.
10. Uy, C. G.; Young, R. C.; Chehreh, M. N. & Scott, R. B. Bronchial challenge studies with cockroach antigen in asthmatic children. *Ann Allergy*. 1973; 31:407-412.
11. Neelan, T.; Brata-Maitra, S.; Saha, G.; Modak, A. & Haitti, A. Role of cockroaches in allergy to house dust in Calcutta, India. *Ann Allergy*. 1990; 64: 155-157.
12. Mendoza, J. & Snyder, R. D. Cockroach sensitivity in children with bronchial asthma. *Ann Allergy*. 1970; 28:156-162.
13. Richman, P. G.; Khan, H. A.; Tuketaub, P. C.; Malveaux, F. J. & Baer, H. The important sources of german cockroach allergens as determined by RAST analyses. *J. allergy Clin. Immunol*. 1984; 73: 590-595.
14. Calderón, O.; Riggioni, O.; Solano, M.; Sánchez, Cl. Reactividad de ochenta pacientes alérgicos a extractos de dos especies de cucarachas domiciliarias de Costa Rica. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*. 1992; 13 (1, 2): 3-7.
15. Calderón, O., Sánchez, Cl.; Solano, M.; Riggioni, O. Evaluación de tres métodos de extracción de alérgenos provenientes de cucarachas. *Revista Costarricense de Ciencias Medicas*. 1993; 14(1,2) (en prensa).
16. Schou, C.; Liad, P.; Fernández-Caldas, E., Lockey R. F. & Lowenstein, H. Identification and purification of an important cross-reactivity allergen from American (*Periplaneta americana*) and German (*Blattella germanica*) cockroach. *J of Allergy Clin Immunol*. 1990;86: 935-946.
17. Wu, C. & Lan, J. Cockroach hypersensitivity: Isolation and partial characterization of major allergens. *J. allergy Clin. Immunol*. 1988; 82: 727-735.
18. Kang, B.; Chang, J. & Johnson, J. Characterization and partial purification of the cockroach antigen in relation to house and house dust mite. *Ann Allergy*. 1989. 63:207-212.
19. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Ann Biochem*. 1976; 72:248-254.
20. Laemmli, V. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
21. Weber, K & Osborn, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. of Biol. Chem*. 1969; 244 (16): 4406-4412.