

# Murciélagos y ácaros en la alergia respiratoria

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

División Alergia, Hospital de Clínicas, 2da Cátedra de Microbiología, Facultad de Medicina (UBA), Sociedad Científica Argentina.

## Resumen

Se valoró la posibilidad de que estos mamíferos ingirieran ácaros del hábitat (*Dermatophagoides pteronyssinus*), y que sus antígenos formaran parte de las heces del murciélago (murcielaquina), y resultaren indirectamente alergénicos para los pacientes atópicos que habían revelado hipersensibilidad a dichas heces.

**Palabras claves.** Murciélagos, ácaros, antígenos ocultos, murcielaquina.

## Bats and house-dust mites in respiratory allergy

### Summary

The possibility that house-dust mite antigens coming from *Dermatophagoides pteronyssinus* were hidden in bat feces was studied in those atopic patients suffering rhinitis and asthma that revealed hypersensitivity to bat feces.

**Key words.** Bat, house-dust mites, hidden antigens, bat feces.

## Introducción y antecedentes de investigación

Los murciélagos (BAT) pertenecen al orden *Chiroptera*, que en latín significa animales con “manos en forma de alas”. Son mamíferos vertebrados, o sea, que poseen glándulas mamarias, piel cubierta de pelo, sus crías nacen vivas de la madre luego de su gestación y se alimentan de leche materna. Son el grupo de mamíferos más disperso después de los roedores, y pueden volar pues su cuerpo está anatómicamente diseñado para ello. Las alas, que son sus manos, poseen dedos alargados –excepto el pulgar– cubiertos por una membrana llamada “patagio”, de 2 capas de piel y una capa central de fibras musculares, vasos sanguíneos y fibras nerviosas.

Existen 2 grupos dentro de los Chiropteros: los megaquirópteros y los microquirópteros. Los primeros o *Pteropodidae* se dividen en 2 subfamilias, 42 géneros y 175 especies, siendo los mayores de hasta 1,80 m de envergadura. Poseen ojos muy desarrollados, son frugívoros y habitan en África, Asia y Oceanía, donde el clima es tropical o subtropical. El ejemplo es la llamada “zorra voladora” o *Pteropus giganteus*. El otro suborden es el de los microquirópteros, que habitan en todos los ecosistemas, y que con gran diversidad evolutiva y adaptativa llegan a 1.200 especies en todo el mundo. Viven en lugares cerrados y oscuros, como cuevas, grietas, árboles, oquedades de paredes y riscos, y en casas y edificios abandonados, minas, campanarios de iglesias, diques y puentes.<sup>1-4</sup>

Se han adueñado de los taparrollos de los edificios de los departamentos de las grandes ciudades, y en Buenos Aires constituyen una de las tantas plagas que la asolan.

Los BAT poseen ojos y oídos adaptados al vuelo nocturno, y no son ciegos como se cree, pero tienen una visión disminuida. Su oído es muy importante ya que poseen un complejo de ecolocación en cuyo principio se basó el sonar, y a su vez la ecografía, que envía señales sonoras de alta longitud de onda que rebotan en los objetos, y que al regresar al BAT se captan por un epitelio especializado de sus orejas y rostro, y se traducen e interpretan en el cerebro formando una imagen del ambiente físico, y así se guía sin golpearse contra las paredes o contra ellos mismos. Así, este sistema les resulta muy útil para localizar a sus presas, determinando tamaño, forma, velocidad y textura, todo ello mientras vuelan. Se alimentan de insectos, flores, néctar, frutos, y tan sólo el 1% come ranas, roedores, peces y aves y otros pequeños vertebrados.<sup>5-9</sup>

En América Latina, sólo 3 especies se alimentan de sangre del ganado, aves de corral, reptiles e incluso humanos. El vampiro común o *Desmodus rotundus* posee potentes activadores plasminógenos en su saliva que conducen a la lisis rápida de los coágulos sanguíneos, y que, han dado motivo para la

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

investigación básica y aplicada por sus propiedades trombolíticas en el infarto agudo del miocardio, el accidente cerebro-vascular y la embolia pulmonar

El principal beneficio ecológico que aportan estos mamíferos voladores es el control natural de las plagas de insectos. Un solo BAT puede comer hasta 1.000 mosquitos por hora. Una colonia de 20 millones de individuos puede consumir en una noche hasta 10 toneladas de insectos lo cual significa la salvaguarda de millones de hectáreas de campos de cultivo. También son útiles en la eliminación de mosquitos vectores de enfermedades, pero pueden diseminar otras producidas por bacterias (*Leptospira spp*), hongos (*Histoplasma capsulatum*) y parásitos.

En nuestro país, no existen muchos estudios sobre la transmisión de infecciones de BAT a humanos aunque el grupo de virus zoonóticos más importante relacionado con los quirópteros es el de los *lisavirus* que pertenecen a la familia *Rhabdoviridae*, donde se halla el virus de la rabia, que fue aislado de especies de BAT insectívoros, frugívoros y hematófagos en el mundo entero. Si bien los roedores se consideran la fuente principal de infección por hantavirus en humanos, la transmisión de humano a humano de un linaje del ANDV (virus de los Andes, un nuevo tipo de hantavirus) fue demostrada. Desde 1997, en Argentina, Chile y Uruguay, se describieron casos asociados al ANDV y relacionados con roedores, aunque los BAT podrían ser reservorios del virus, como fue detectado en Corea (1989-1992) en la especie *Eptesicus serotinus*, en biopsias de pulmón y riñón del mamífero. Nuestro estudio abarca al *Tadarida brasiliensis*, ocupante de nuestros taparrollos de ventanas ciudadinas, únicamente insectívoro, que se ubica a lo largo de todo el país, con excepción de Chaco, Corrientes y Santa Cruz, quizás por razones climatológicas. Si bien el último caso de rabia urbana de Buenos Aires se había registrado en 1981, en febrero de 1991, una niña mordida en Barracas por un BAT portador del virus de la rabia, alertó sobre la posibilidad de esta afección, que se resolvió satisfactoriamente. En nuestros trabajos pioneros sobre la antigenicidad de las heces de los BAT (hBAT), se señaló que una nueva plaga se había adueñado de los altos edificios y de las casonas de la CABA. Estos mamíferos se ocultan en la caja del tambor de las persianas de las ventanas, y allí permanecen durante el día y salen a buscar sustento durante la noche. Su orina, heces y pelos contaminan estos refugios y provocan un desagradable olor que invade las habitaciones humanas. Ante versiones de pacientes atópicos respiratorios que sufrían cierto empeoramiento en estas habitaciones, se estudió el papel de las hBAT en el síndrome rinitis/asma de este reducido grupo de enfermos. Se tomó una muestra de gránulos negros de 2 a 4 mm, y se preparó un extracto según Frugoni-Hansen, que se sometió a una cromatografía por columna de Sephadex G-150. Se obtuvo un antisuero específico de conejo para las diversas técnicas serológicas. La electroforesis en SDS-polia-

crilamida y la inmunotransferencia, también se aplicaron a las hBAT y a su antisuero. Se estudiaron pacientes atópicos y controles normales con hBAT, y con sus sueros se determinó la presencia de una IgE específica (RAST). La cromatografía reveló un único pico proteico con un alto contenido de hexosas, y las técnicas serológicas mostraron la existencia de anticuerpos IgG específicos en el modelo animal. No hubo reacciones cruzadas con antígenos como el pelo y la caspa de los BAT, el suero de la rata, su pelo y su caspa y las heces de las palomas. Las pruebas cutáneas de hipersensibilidad inmediata fueron positivas en un 29.78 % con hBAT, y en un 21,27% con el pico proteico con una correlación con el RAST-IgE anti-hBAT del 83,94%. Los habitantes de los edificios altos revelaron un título mayor que los de las casonas viejas, aunque el reducido número de casos es estadísticamente discutible. El SDS-PAGE reveló 13 bandas entre los 29 kDa y los 116 kDa, con una inmunotransferencia entre los 45 kDa y 66 kDa. La dificultosa obtención de las proteínas séricas del BAT impidió valorar su participación en la hipersensibilidad.<sup>10-15</sup> Habiendo demostrado que las hBAT son capaces de generar anticuerpos específicos IgG e IgE, tanto en los animales como en los humanos atópicos con enfermedad respiratoria, así como una típica neumonitis por hipersensibilidad en cobayos aerosolizados con hBAT, se analizó si el o los antígenos responsables podrían ser proteasas, tal como sucede con los ácaros y los blátidos. Para ello, las hBAT se estudiaron por SDS-PAGE, *Western-blot* y *gelatinolisis*, con y sin inhibidores específicos de las proteasas, tales como el E-64 [*L-trans-epoxy-succinylleucylamido (4-guanidino)-butano*], el TLCK (*tosyl-lysyl-chloro-methyl-cetona*), el TPCK (*tosyl-fenil-alanyl-chloro-metil-cetona*), el PMSF (*fenil-metil-sulfonil-fluoride*), la leupeptina, la orto-fenantrolina y la pepstatina-A.

Probada la actividad proteásica y la gelatinolisis, se destacó la presencia de 6 a 8 bandas entre los 21 y los 97 kDa con proteólisis a pH 8,5 y con una gelatinolisis muy sensible al TLCK y al PMSF, como una posible serina-simil-tripsina. Los *Western-blots* detectaron bandas de 21 y de 40 kDa, reactivas con los sueros humanos de atópicos y la anti-IgE lo que correlaciona las actividades proteásica y gelatinolítica de las hBAT con su alergenidad.

Kern, en 1921, observó que los pacientes con asma y rinitis presentaban pruebas cutáneas positivas con extractos del polvo obtenido de las casas de los pacientes. Voorhorst, en 1964, descubrió que la actividad del polvo de la casa se debía al ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) y al *D farinae* (Df). Ohman, en 1974, purificó el Fel d 1, en el gato, *Felix domesticus*. En 1980, se purificó el primer alérgeno de los ácaros del polvo, Der p 1, del Dpt, con anticuerpos monoclonales. Thomas, clonó el Der p 1, y obtuvo su secuencia completa, y reveló su homología con cisteín-proteasas. Se sugirió que la exposición a endotoxinas en los primeros años de vida era un factor protector para el desarrollo de las

sensibilizaciones y del asma. Pero, una vez que el paciente se ha sensibilizado y tiene asma, la exposición a las endotoxinas y a los D- glucanos constituye un factor de riesgo para las exacerbaciones del asma.<sup>1-3</sup> Los ácaros domésticos y sus alérgenos desencadenan síntomas respiratorios y cutáneos en los genéticamente predispuestos. Los sensibilizados a los ácaros en las zonas de clima tropical pueden llegar hasta un 30%. Hay más de 40.000 especies de ácaros, pero las vinculadas con la patología alérgica no superan las 25, y los más importantes son los *Pyroglyphidae*, que incluyen a los géneros *Dematophagoides* y *Euroglyphus*. Los ácaros son del *Phylum Arthropoda*, y, presentan patas articuladas y un cuerpo dividido en regiones y revestido por una cutícula rígida endurecida por quitina. Se clasifican en 2 *subphylum*: mandibulados (crustáceos, miriápodos e insectos) y quelicerados (arácnidos, pignogónidos y merostomados). Los arácnidos se clasifican en ácaros, escorpiones y araneidos o arañas. Los ácaros están cubiertos de prolongaciones o setas o pelos, que contienen una sustancia fotorreceptora, la actinoquitina. Las especies con interés en la patología alérgica pertenecen al orden *Astigmata* y sólo 3 de las 11 superfamilias que lo componen son las responsables de los problemas alérgicos: *Pyroglyphoidea*, *Acaroidea* y *Glycyphagoidea*. La superfamilia *Acaroidea* está compuesta por 4 familias, de las cuales tienen interés *Acaridae* y *Suidassidae*. La primera tiene 79 géneros, siendo los más importantes, *Acarus*, *Tyrophagus* y *Aleuroglyphus*. A la familia *Suidassidae* pertenece *Suidasia medanensis* que abunda en el Caribe. Los ácaros miden de 100 a 300 micras, y el cuerpo dividido en 2 regiones, el prosoma y el opistosoma. Las hembras son de mayor tamaño que los machos. Producen bolitas fecales esféricas (10-40 micras) que son la fuente principal de alérgenos. Se alimentan de las escamas humanas, hongos, fragmentos de insectos, vegetales y otros ácaros. El ciclo consiste en 5 estadios (huevo, protoninfa, trioninfa y adultos), que completa en 2-6 semanas. La hembra pone hasta 250 huevos y los adultos viven hasta 150 días. El ciclo del Dpt de huevo a adulto dura 122 días a 16°C y 75% de humedad, mientras que a 35°C sólo tarda unos 15 días. Los ácaros causantes de alergia en el hombre se localizan en 2 hábitats diferentes: viviendas y almacenes. Los primeros se denominan "ácaros domésticos" o "del polvo de casa", y son *Pyroglyphidae*. Se alimentan de escamas humanas y habitan los dormitorios, colchones y muebles revestidos de tela. La determinación de alérgenos por anticuerpos monoclonales demostró que los niveles críticos para sensibilizar están en 2 mcg/g de polvo para los alérgenos del grupo 1 de Dpt, mientras que las cifras superiores a 10 mcg/g de polvo indican un riesgo para sufrir asma. La detección de guanina es un método para estimar la cantidad de alérgeno de los ácaros en el polvo pues esta purina es el principal producto nitrogenado en sus heces. En la especie Dpt se han descrito 17 alérgenos, desde Der p

1 hasta Der p 11 y desde Der p 14 hasta Der p 19. Los alérgenos de los grupos 12 y 13 se han descrito en otras especies (*Acarus siro* y *Blomia tropicalis*). Los alérgenos con actividad enzimática pertenecen a los grupos 1, 3, 4, 6, 8, 9, 15, 18 y 19 del Dpt. El **grupo 1** son glicoproteínas de 25 kDa del tipo cisteín-proteasa, como la papaína, bromelina y catepsina. A este grupo pertenecen Der p 1, Der f 1 y Eur m 1. Están en el aparato digestivo y en las partículas fecales. Su ADN fue clonado y sintetiza una proteína de 223 aminoácidos. Altera el epitelio respiratorio y facilita el acceso del alérgeno a las CPA. Escinde al CD23 de los LT y favorece la síntesis de IgE y al CD25 favoreciendo una respuesta Th2. El **grupo 3** lo componen el Der p 3, Der f 3 y Eur m 3 de 25 kDa con actividad de serin-proteasa (tripsina), y como los del grupo 1 son reconocidos por el 90% de los pacientes atópicos. El **grupo 4** tiene a Der p 4 y Der f 4 con 56 kDa, homología con la amilasa y una frecuencia de unión a IgE del 25-45%. El **grupo 6** tiene a Der p 6 y a Der f 6 con 25 kDa y actividad de serin-proteasa (quimiotripsina), y sólo lo reconocen el 38% de los alérgicos. El **grupo 8** tiene al Der p 8 con 26 kDa, homología con la glutatión-S-transferasa de rata y ratón, y con un 25% de homología con el Bla g 5 de *Blatella germanica*. El **grupo 9** posee al Der p 9 con 28 kDa y 3 isoformas reconocidas por más del 90% de los atópicos. Es gelatinolítico y cruza con Der p 3 y Der p 6. El **grupo 15** tiene a Der f 15 con 98 kDa y es similar a la quitinasa de los insectos. Lo reconocen el 95% de los atópicos y de los perros sensibilizados a ácaros. El **grupo 18** posee el Der f 18 con 60 kDa y es una quitinasa y el **grupo 19** tiene al Blo t 19 con 7,2 kDa, que es una quitinasa, y sólo lo reconocen el 10% de los alérgicos.

Hay grupos que se unen a ligandos, y ellos son el 2, 13, 14, 16 y 17. El **grupo 2** son proteínas no glicosiladas de 14 kDa, 129 aminoácidos y 6 residuos de cisteína. Tienen 88% de homología entre sí. Son reconocidos por el 80% de los atópicos. El **grupo 13** tiene a Blo t 13 con 15 kDa, y gran homología con proteínas citosólicas que unen ácidos grasos. El **grupo 14** posee a Der f 14 de 190 kDa, que es similar a la apolipoforina. El **grupo 16** posee a Der f 16 de 53 kDa, y que es reconocida por el 35% de los alérgicos y el **grupo 17** tiene a Der f 17 de 30 kDa, que es una proteína fijadora de calcio. Otros tienen actividad sobre el citoesqueleto, y ellos son el 10 y el 11. El **grupo 10** corresponde a la tropomiosina de los ácaros que con 33 kDa involucra a Der p 10 y a Der f 10 presentando homología con otras tropomiosinas (crustáceos, moluscos, insectos y parásitos), siendo importantes en alergia clínica. El **grupo 11** es homólogo de la paramiosina del músculo de los invertebrados, y se halla en Der f y en Blo t con 110 kDa. Finalmente, hay 3 grupos con actividad biológica desconocida aún que son el 5, 7 y 12. El **grupo 5** con 13 kDa y 113 aminoácidos se halla en Der p y en Blo t; el **grupo 7** con 22 kDa se halla en Der p 7 y en Der f 7 y el **grupo 12** con 16 kDa es una quitinasa que se halla en Blo t 12. Los ácaros actúan como alérgenos del interior produciendo patología alérgica respira-

toria y ocular, como trofoalérgenos (contaminando alimentos) y parasitando plantas (araña roja o *Tetranychus urticae*) induciendo rinitis/asma en trabajadores del invernadero.<sup>16-20</sup>

### Objetivos del presente trabajo

Valorar en atópicos con el síndrome rinitis/asma que hubieren revelado hipersensibilidad a los antígenos de las hBAT y a los ácaros Dpt, si la hipersensibilidad a los primeros podría tener que ver con una *sensibilidad encubierta* a los antígenos de los segundos por haber éstos sido comidos por los BAT, digeridos y eliminados en sus heces contaminando el hábitat. Un grupo control de sujetos totalmente sanos sin patología respiratoria y no atópicos se empleó para certificar el fenómeno de hipersensibilidad que se estudia.

### Materiales y métodos

1. *Pacientes*: Se estudiaron 20 sujetos atópicos con antecedentes heredo-familiares que padecían el síndrome rinitis/asma, 13 mujeres y 7 varones, con edades comprendidas entre los 25 y 55 años, con una IgE sérica total promedio de 145 KU/L, con empeoramiento sintomático en los dormitorios de sus viviendas o ante el polvillo habitacional de las mismas, y pruebas cutáneas de reacción inmediata positivas mayores a 15 mm a los extractos de Dpt y de las hBAT diluidos 1/100. La búsqueda de una IgE sérica mono-específica (ELISA) resultó positiva para *ambos* antígenos con valores superiores a 0,35 PRU/ml (clase I). Por otro lado, un grupo control de 10 sujetos sin patología respiratoria o cutánea, sin antecedentes heredo-familiares de atopía, con una IgE sérica total promedio de 49 KU/L, y con pruebas cutáneas de hipersensibilidad inmediata a los antígenos estudiados totalmente *negativas* fue seleccionado para el estudio. No pareció razonable la realización del ELISA control ante la situación clínica y bioquímica de estos sujetos.

2. *Fraccionamiento por columnas*: Tanto el extracto del Dpt (*Center Lab. Kit n° 6F-00762 de 5000 AU*) como las hBAT fueron sometidos –separadamente– a un pasaje por columnas de Sephadex G-50 y de DEAE-celulosa para valorar su composición proteica e hidrocarbonada. Estas columnas eran de 10 mm x 460 mm la primera, y de 25 mm x 380 mm la segunda. En la primera elución se empleó un *buffer* de fosfato-ClNa 0,15 M a pH 8 y a 4º C, y, en la segunda, un *buffer* de fosfato de pH 8 con molaridades cambiantes entre 0,01 y 0,02. Los contenidos proteicos fueron determinados por absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro *Metrolab* y los azúcares a una absorbancia de 470 nm en idéntico aparato en comparación con una muestra testigo de galactosa y manosa (método del indol).<sup>21-25</sup>

3. *Determinación cuantitativa de proteínas*: El método de Bradford se aplicó a cada extracto y pico más significativo obtenido en las columnas, empleando como una solución de control a la albúmina sérica bovina (ASB).

4. *SDS-PAGE con gelatina*: A minigeles de 10 x 10 cm cada uno y un espesor de 1,5 mm de acrilamida al 10%, según Laemmli, le agregamos gelatina al 0,15%. Ya sembrados se sometieron a 120 V por 2 horas. Cuando el control de azul de bromofenol llegó al final de la corrida, ésta se detuvo y los geles se lavaron 2 veces en agua destilada con Triton-X-100 al 0,1%, por 15 minutos cada lavado, y se incubaron a 37º C en un *buffer* MES (2-(N-morpholino) etano-ácido sulfónico a pH 6, en Tris AcH 100 mM a pH 3,5 y en Tris ClH 100 mM a pH 8,5, siempre con dithiothreitol (DTT) al 0,5 mM. La reacción se detuvo y las proteínas se colorearon con azul brillante de Coomassie R-250 en metanol-ácido acético-agua en las proporciones 5:1:5 (v/v/v) a la temperatura ambiente. Luego se decoloraron con metanol al 20% y ácido acético al 10%, y las bandas activas se observan sin color sobre un fondo azul intenso. Luego, los lavados e incubaciones se hicieron con y sin inhibidores de las actividades proteásicas y gelatinolíticas, que fueron: el E-64 en 100 mM, el TLCK en 0,5 a 1 mM, el TPCK en 0,5 a 2 mM, el PMSF en 2 mM, la leupeptina en 100 mM, la orto-fenantrolina 1 mM y la pepstatina –A 100mM. Los pesos moleculares de los marcadores proteicos fueron: la fosforilasa-b (97,4 kDa), la ASB (66 kDa), la ovoalbúmina (45 kDa), la anhidrasa carbónica (29 kDa), el inhibidor de la tripsina (21,5 kDa) y la lisozima (14,4 kDa). Cuando se valoró el efecto inhibitorio de la actividad enzimática y gelatinolítica, antes y después de las absorciones, se utilizaron: la alfa-2-macroglobulina (180 kDa), la beta-galactosidasa (120 kDa), la fructosa-6-fosfoquinasa (84 kDa), la piruvatocinasa (66 kDa), la fumarasa (55,3 kDa), la lactato-dehidrogenasa (43,6 kDa) y la triosa-fosfoisomerasa (30 kDa), que actuaron como patrones comparativos para estimar su peso molecular. Para detectar en los extractos una actividad enzimática se empleó la técnica de J J Cazzulo, con un sustrato de 0,3 mM de Bz-Pro-Phe-Arg-pNa (Bz-PFR-pNa). Ninguna muestra corrida en los geles fue reducida o calentada antes de ser sembrada.<sup>26-30</sup>

5. *Western-blots*: Las muestras, tratadas o no con DTT, se corrieron en un gel de poli-acrilamida al 10% con dodecil-sulfato (SDS-PAGE), electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa, lavadas una hora en un *buffer* de Tris-solución fisiológica pH 7,6 conteniendo ASB al 2%, y luego, incubadas con los antisueros contra el Dpt y las hBat al 1/250, en el caso de los de conejo, y al 1/10 en los humanos atópicos respiratorios. Luego de la incubación por la noche, se lavaron las membranas 3 veces y se incubaron, con una IgG de cabra anti-conejo al 1/3.000 conjugada con fosfatasa alcalina, las tratadas con los sueros de conejo, y, con una IgG de conejo-anti-IgE humana específica para cadena  $\kappa$  al 1/500, las de los sueros humanos conjugada con fosfatasa alcalina. El revelado se hizo con NBT o *nitro-blue* de tetrazolio y con 5-Br-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP), coloreando las bandas positivas con anticuerpos, y a los anti-anticuerpos marcados.

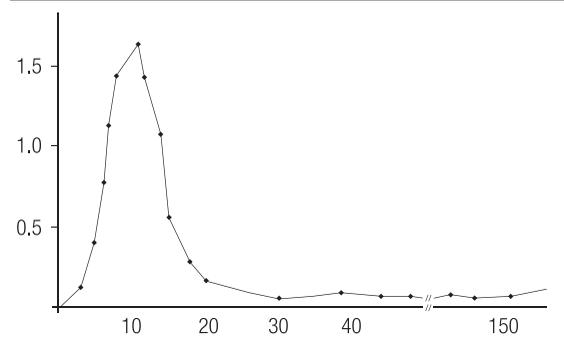
6. *Absorciones de los inmunosueros y ELISA:* Un mililitro del suero del paciente atópico con sensibilidad al Dpt y a las hBAT fue incubado a 37° C en un baño de María con un mililitro de extracto de Dpt 1/10 durante una hora. Luego se centrifugó a 500 r.p.m. por 5 minutos, y el sobrenadante se trasvasó a un recipiente y se guardó a -20° C, rotulándose: **suero A**. Lo mismo se realizó con otro mililitro del suero del mismo paciente, que se incubó con un mililitro de las hBAT 1/10, durante igual tiempo, con idénticos pasos, rotulándose: **suero B**.

Los sueros **A** y **B** fueron testificados por ELISA empleando como antígenos el Dpt y las hBAT, por separado, para valorar si el procedimiento de absorción había modificado la cantidad de anticuerpos anti-ácaro y anti-heces previos a las absorciones. Estos sueros **A** y **B** se sometieron al SDS-PAGE y *Western-blots* para valorar la existencia o no de las bandas detectadas antes de las absorciones respectivas, así como, analizar si las propiedades gelatinolíticas habían sufrido cambios significativos o no.

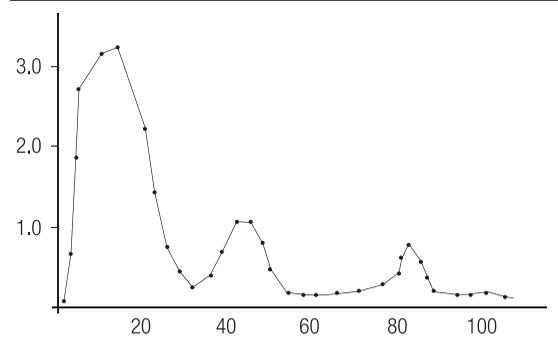
## Resultados

1.- La columna de Sephadex G-50 del Dpt reveló un pico proteico a 280 nm de DO (densidad óptica) entre los tubos 5 y 15, y 3 de hexosas en los picos 15, 40 y 80 a 470 nm de DO. En la columna de DEAE-celulosa se vieron 4 picos proteicos en los tubos 20, 40, 80 y 150, mientras que, la valoración de las hexosas reveló 5 picos a 470 nm de DO en los tubos 30, 70, 100, 160 y 180, según la variación del *buffer* desde pH 8 hasta pH 6 y de 0,01 M hasta 0,2 M, que correspondían a 10.000, 6.000, 3.000, 1.500 y 4.000 mcg%, respectivamente (Figuras 1, 2 y 3). La columna de Sephadex G-150 de las hBAT reveló un pico proteico entre los tubos 42 y 57, a 280 nm de DO. Esa columna reveló a 470 nm de DO la existencia de 3 picos de hexosas en los tubos 10, 30 y 50, que correspondían a 8.000, 9.000 y 26.000 mcg% de glúcidos (Figuras 4

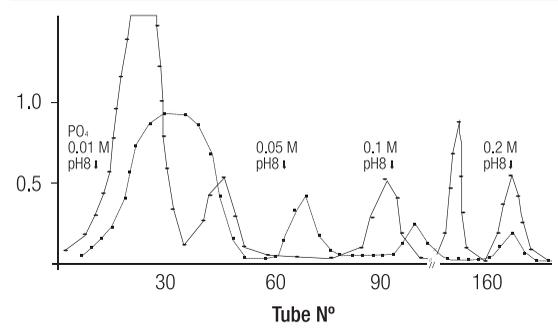
**Figura 1.** Gráfico del pasaje por columna de Sephadex G-50 del extracto del ácaro *Dermatophagoides*. Se observa un gran pico proteico a 280 nm de densidad óptica correspondiente a los tubos 5 a 15.



**Figura 2.** Gráfico del pasaje por columna de Sephadex G-50 del extracto del ácaro *Dermatophagoides*. Se observan 3 picos de hexosas a 470 nm de densidad óptica correspondientes a los tubos 15, 40 y 80.



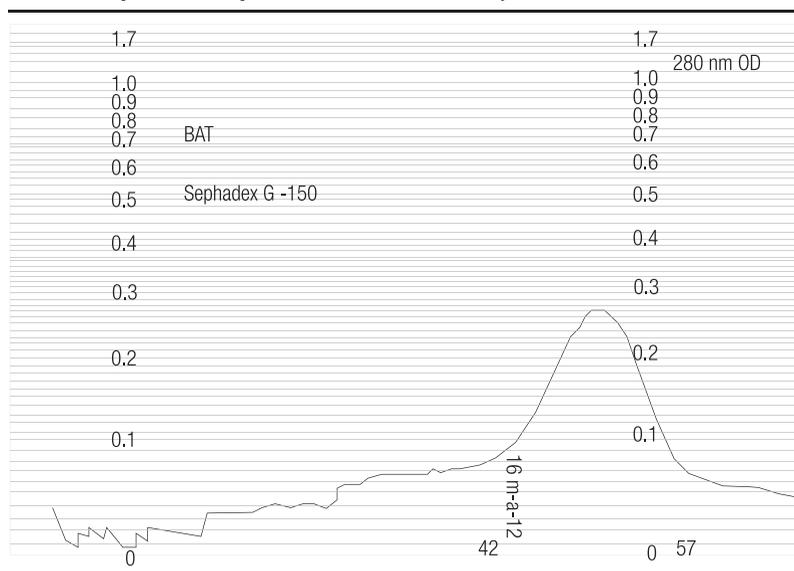
**Figura 3.** Gráfico del pasaje por DEAE-celulosa del extracto del ácaro *Dermatophagoides*. Se observan 4 picos proteicos (tubos 20, 40, 80, y 150), y, 5 picos hexosas (tubos 30, 70, 100, 160 y 180).



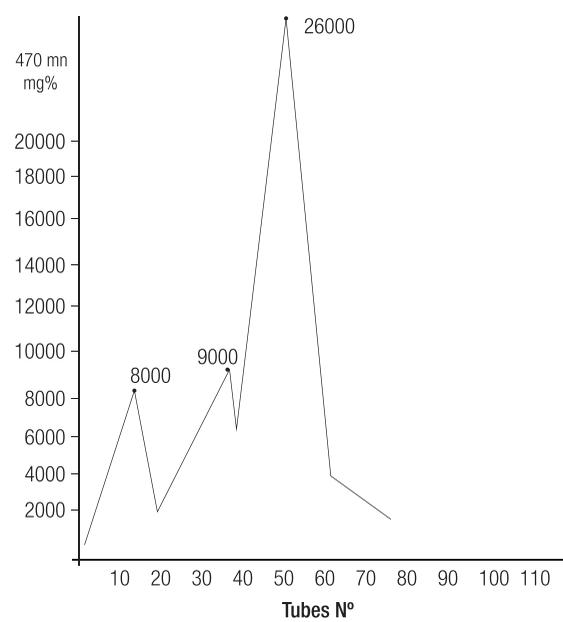
y 5). Un pasaje por columna de Sephacryl-S-200-HR de pelo o epitelio del BAT mostró un pico proteico con 0,11 g/ml de proteínas, que lo convierte en un potente alérgeno ambiental. El SDS-PAGE, los *Western-blots* y la gelatinólisis revelaron que el Dpt posee su actividad entre los 45 y 66 kDa, siendo directamente proporcional a la cantidad del alérgeno, por ejemplo, 1,15; 1,30 y 4,6 mg. La menor actividad fue registrada en los 32 kDa. En un ensayo preliminar con el sustrato Bz-Pro-Phe-Arg-pNa, el Dpt exhibió una actividad de 2,7 U/min/mg, que revela que posee una actividad proteásica con apetencia por la Arg en la posición 1, que podría ser el sitio del clivaje. La proteólisis del Dpt fue analizado a 3 diferentes pHs (3,5; 6 y 8,5) siendo la mayor a pH 6, la menor a pH 8,5 y ninguna actividad a pH 3,5. Los patrones a pH 6 fueron similares con el *buffer* de Tris-AcH 100 mM o el MES 100 mM.

Se cargaron 2,3 mg de proteína pura del Dpt en un gel y se sometió a la electroforesis; cuando la corrida se detuvo, el gel fue cortado en tiras, y éstas incubadas con los inhibidores de las proteasas por 20 horas. Igual número de tiras de Dpt se usaron

**Figura 4.** Gráfico del pasaje por la columna de Sephadex G-150 del extracto de las heces del murciélago. Se observa un gran pico proteico a 280 nm de densidad óptica correspondiente a los tubos 42 y 57.



**Figura 5.** Gráfico del pasaje por la columna de Sephadex G-150 del extracto de las heces del murciélago. Se observan 3 picos de hexosas a 470 nm de densidad óptica que corresponden a los tubos 10, 30 y 50, cuyo contenido en mg % de hexosas totales de consignan.

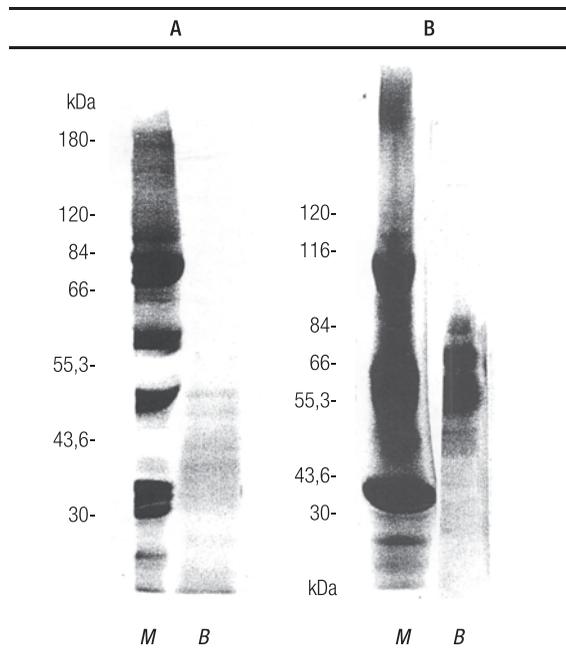


como controles al no ser incubadas. La actividad a pH 6 fue muy sensible al TLCK, mientras que las bandas entre los 45 y 66 kDa, como el de 32 kDa, mostraron un similar patrón de inhibición. El E64 y el TLCK inhibieron totalmente, pero el TPCK y la

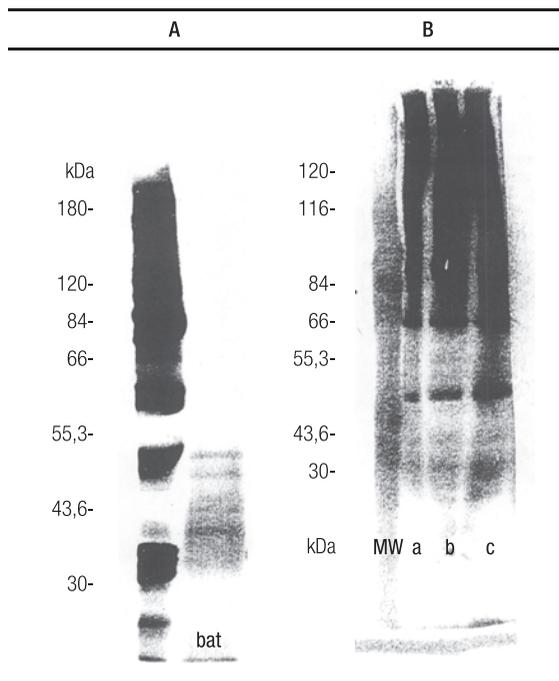
leupeptina, sólo parcialmente. Esto sugiere que el Dpt contiene peptidasas del tipo cisteína en su composición. Además, hay una banda de alto peso molecular con actividad gelatinolítica que no se inhibe por los inhibidores para cisteína, aspártico o metalo-proteasas, pero sí es inhibida por el TLCK, con lo cual se especula que sería una serina, similar a la tripsina. Cuando el Dpt fue separado por SDS-PAGE, transferido a las membranas de nitrocelulosa e incubado con los antiseros específicos de conejo anti-Dpt y anti-humanos de atópicos y reincubados con los anti-anticuerpos respectivos en los *Western-blots*, las bandas con pesos moleculares aproximados a los 200 kDa, 110 kDa, 65 kDa, 60 kDa y 43 kDa mostraron reactividad positiva, lo cual las involucra en la respuesta inmune específica contra los antígenos del Dpt en los co-

nejos y en el humano atópico. Similar resultado se logró al procesar las muestras con el reductor DTT (o sin él), que sugiere que las uniones disulfuro no estarían en las bandas detectadas, y se asumiría que en el Dpt, la banda de 200 kDa, por su actividad gelatinolítica tendría capacidad inmunizante tanto en el animal como en el humano. Se señala que una proteína sola no compone cada banda en el SDS-PAGE y en el *Western-blot*. Con las hBAT, ya comprobada la actividad proteásica y la gelatinolítica, se detectaron 6 a 8 bandas entre los 21 y los 97 kDa, con una proteólisis a pH 8,5 y con una gelatinolisis altamente sensible al TLCK y al PMSF revelando su actividad de serina-simil-tripsina. Por los *Western-blots* se detectó que las bandas de 21 y de 40 kDa eran reactivas con los sueros humanos de atópicos y la anti-IgE, lo que correlacionaría las actividades proteásica y gelatinolítica de las hBAT con su alergenicidad. Las absorciones de los sueros humanos de atópicos mostraron que, un suero positivo por ELISA con título  $\geq$  de 0,35 PRU/ml para Dpt al ser absorbido con ácaros reveló ser negativo en la ulterior determinación (*suero A*). Este mismo suero al ser retestificado con las hBAT como antígeno reveló un ELISA positivo de 0,40 PRU/ml, lo cual sostiene la inhibición por el Dpt, pero la capacidad de detectar antígenos de las hBAT. Por el contrario, el llamado *suero B*, es decir, aquel absorbido con las hBAT y retestificado tanto con el Dpt como con las hBAT, apareció totalmente negativo. Estos hallazgos conducen a la presunción de que las hBAT contiene un alérgeno del Dpt o bien comparten algún péptido que desaparece en las absorciones, y que se modifica en la gelatinolisis (Figuras 6, 7, 8, 9, 10 y 11).

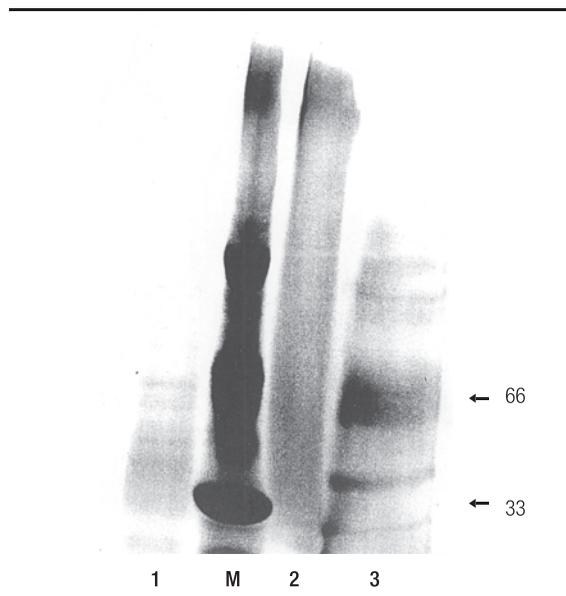
**Figura 6.** A: SDS-PAGE del extracto de las heces del murciélago. Varias proteínas se observan entre 29 y 120 kDa. B: Western-blot del mismo extracto con suero atópico. Resultados positivos se observan entre 45 y 66 kDa. (M: marcadores proteicos, B: BAT).



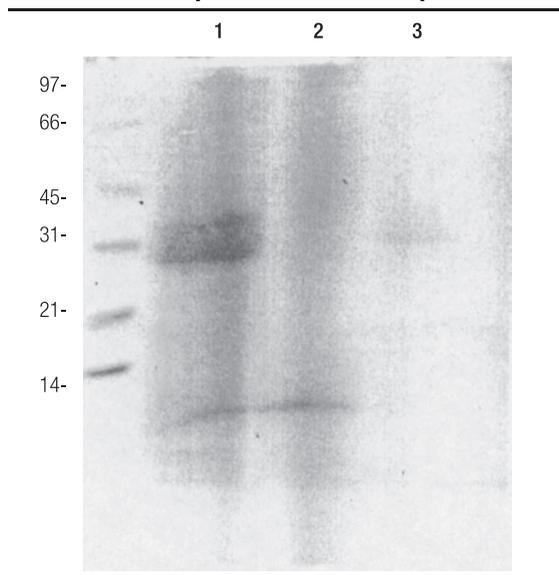
**Figura 8.** A: SDS-PAGE del extracto de las heces del murciélago. Se observan varias proteínas entre los 29 y 120 kDa (M: marcadores proteicos). B: Western-blot donde a. Dermatophagoides + suero atópico; donde b. BAT + suero atópico; donde c. epitelio + suero atópico. Se observan bandas que concuerdan entre los 30 y 45 kDa (MW: molecular weight o peso molecular).



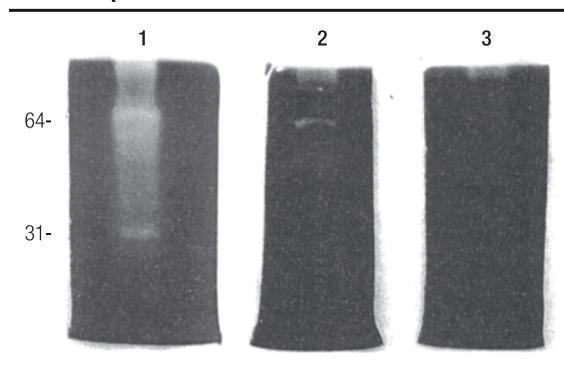
**Figura 7.** SDS-PAGE: donde 1 corresponde a Dermatophagoides; donde 2 corresponde a marcadores proteicos; donde 3 corresponde al Dermatophagoides absorbido con anti-BAT y no se observan bandas; donde 4 corresponde a BAT absorbido con anti-ácaros y se observan bandas remanentes entre los 33 y 66 kDa.



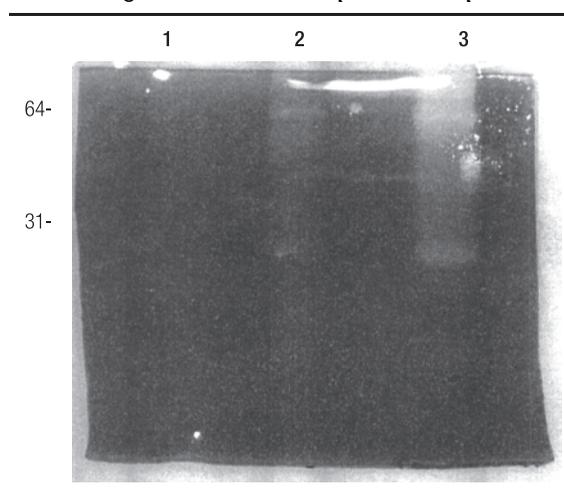
**Figura 9.** Western-blots: 1. BAT + suero anti-BAT: se observan varias bandas entre 30 y 45 kDa. 2. BAT + suero anti-gramíneas: no se observan bandas. 3. BAT + suero anti-Triatoma: no se observan bandas. Los números indican los pesos moleculares empleados.



**Figura 10.** SDS-PAGE con gelatina: 1. BAT: pH 8,5: gelatinolisis intensa; 2. BAT: pH 6: gelatinolisis débil; 3. BAT: pH 3,5: negativo. La gelatinolisis indica la presencia de proteasas.



**Figura 11.** SDS-PAGE con gelatina: 1. Dermatophagoides: pH 3,5: negativo; 2. Dermatophagoides: pH 8,5: débil gelatinolisis; Dermatophagoides: pH 6: gelatinolisis intensa. La gelatinolisis indica la presencia de proteasas.



## Discusión

Los alérgenos poseen en su composición enzimas que facilitarían procesos biológicos naturales. En los pacientes atópicos, estas enzimas demostradas en familias de pólenes anemófilos y de extractos de insectos, desempeñarían un papel activo sobre la mucosa respiratoria para "anidarse" en ella o para interactuar con sus células. Desde la fosfatasa ácida de los pólenes de las gramíneas hasta los hallazgos sobre las proteasas de los insectos, varios autores señalaron la importancia de estas enzimas en la génesis de la enfermedad respiratoria y en la producción de anticuerpos específicos. Estudios anteriores identificaron a una novel serina-proteasa con acti-

vidad alérgica en el Dpt. Empleando inhibidores específicos de clase y cromatografía de afinidad para determinar los sitios activos, se halló que la actividad proteolítica del Der p 1, perteneciente al grupo I de los alérgenos del Dpt, influencia su capacidad antigénica dado que el grupo exhibe una actividad de los tipos cisteína-serina-proteasa. Al utilizar la insulina B como sustrato, la cisteína-serina-proteinasa del Der p 1 mostró sus preferencias por el ácido glutámico y la arginina, en la posición 1. En nuestros extractos, encontramos peptidasas que clivan al sustrato sintético en el aminoácido Arginina (Arg), pues podrían pertenecer a los grupos de cisteína, serina o a ambos. Los Dpt y Df contienen enzimas entre los 25 y los 30 kDa, que son serina-proteasas, con las características de la tripsina, quimiotripsina y símil-elastasa. Las proteasas provocan un incremento de la permeabilidad vascular, de una liberación masiva e inespecífica de citoquinas de bajo peso molecular y de una amplificación de la trans migración endotelial. Estos hechos son trascendentes en la génesis y mantenimiento de la inflamación alérgica, y las proteasas son inmunogénicas por ser proteínas heterólogas de estructura fisicoquímica compleja, y en ocasiones con una tridimensionalidad difícil de analizar, lo cual las convierte en agentes que incrementan la agresión tisular y la signo-sintomatología del paciente atópico a su merced. El Der p 5 y el Der f 5 con un peso molecular de 25 kDa al utilizar SDS-PAGE bajo condiciones reductoras, y con un peso molecular de 27 kDa luego de la columna de Sephadex G-75, al ser sometidos a diversos inhibidores de la actividad proteásica, demostraron pertenecer a la familia de la quimiotripsina-símil-serina. El clonado y secuenciación del grupo 6 de los alérgenos del Dpt demostró poseer la tríada Hys-Asp-Ser de las serinas-proteasas con un peso molecular de 24,9 kDa y un 37% de identidad con la tripsina del Der p 3. Por su parte, el Der p 9 fue aislado y caracterizado como una serina proteasa colagenolítica de 23 kDa.<sup>31-35</sup> En el Dpt se detectó gelatinolisis en una banda entre los 45 y 66 kDa, y una actividad menor en los 32 kDa, siempre a un pH 6. Con los inhibidores de las proteasas se concluye que en este alérgeno predominarían las cisteína-peptidasas. Con el *Western-blot* se vieron bandas en los pesos moleculares de 200, 110, 65 y 43 kDa, aunque la primera resaltó la de mayor antigenicidad frente a los antisueros de los atópicos, y que no podía ser inhibida si no era por el TCLK. Así, se asume que el Dpt posee 2 tipos de peptidasas (cisteína y serina), lo cual le confiere una actividad como moléculas enzimáticas y como antígenos intensamente inmunogénicos. Los experimentos de *absorción* de los sueros de atópicos con pruebas cutáneas positivas al Dpt y a las hBAT, al igual que poseedores de IgE-ELISA positiva  $\geq 0,35$  PRU/ml, para ambos antígenos resultaron importantes pues anulan la positividad al incubarse con Dpt y volver a retestificar con el mismo persistiendo aún la positiv-

dad frente a las hBAT, pero ocurriendo lo contrario al incubar con las hBAT y lograr la negativización de las pruebas IgE-ELISA posteriores con ambos antígenos. Si bien la absorción es específica para cada uno de los alérgenos sensibilizantes, debe tenerse en cuenta que las hBAT es una mezcla más compleja de antígenos entre los cuales podría estar representado algún epítopo o determinante alergénico del Dpt, y así ser uno de los responsables de la hipersensibilidad bioquímica y clínica. La anulación de algunos aspectos de la gelatinólisis de las hBAT con la absorción por el Dpt intentan reforzar la hipótesis del presente trabajo que sostiene que en las hBAT hay un determinante antigénico (proteásico/gelatinolítico) que está presente en el Dpt, o que, por otro lado, ambos antígenos comparten un epítopo que por su naturaleza, y no por la ingesta del mamífero, estaría presente en ambos (¿tropomiosina?). Recientemente, la Dra Silvia G Irañeta detectó antígenos del hongo anemófilo *Aspergillus flavus* en las hBAT, lo que ha motivado otra vía de investigación, y enfatiza la importancia ecológica de las hBAT.<sup>36-40</sup>

## Bibliografía

- Suárez Álvarez R.O. Posible dispersión de patógenos de importancia médica por murciélagos que habitan nichos asociados a zonas urbanas. Bol. Asoc. Arg. Microb. 2011; 194: 9-13.
- Bárquez R.M. Guide to the bats of Argentina. Special publication of the Oklahoma Museum of Natural History. University of Oklahoma. Norman, 1993; 1-119.
- Canteros C.E. Primer aislamiento de *Histoplasma capsulatum* de murciélago urbano *Eumops bonariensis*. Rev Argent Microbiol, 2005 ; 37 (1): 46-56.
- Constantine D.G. Health precautions for bat researches, In: T.H.Kunz (ed.), Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats, London: Smithsonian Institution Press, 1988; 491-528.
- Dohmen F.G. & Beltrán F. Aislamiento de virus rábico en glándulas salivales de murciélagos insectívoros. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2009; 28 (3): 987-993.
- Kim G.R. A new natural reservoir of hantavirus: isolation of hantavirus from lung tissues of bats. Arch. Virol., 1994; 134 (1-2): 85-95.
- Vaccaro O.B. Quirópteros de la ciudad de Buenos Aires y de la provincia de Buenos Aires. Rev. Mus. Argent. Cienc. Nat., 2001; 3 (2): 181-193.
- Alonso A., Scavini L.M., Rodríguez S.M., Pionetti C.H. Propiedades inmunoquímicas de las fracciones solubles del *Dermatophagoides farinae* en los animales y en el hombre. Allergol et Immunopathol., 1980; VIII: 111-116.
- Spadaro N., Mouchián K., Scavini L. M., Pionetti C.H., Alonso A. Caracterización, antigenicidad e incidencia de las fracciones solubles del polvillo habitacional y sus ácaros en las IgE e IgG séricas mono-específicas. Rev. A.M.A., 1981; 94 : 66-73.
- Alonso A., Irañeta S., Rodríguez S., Scavini L. Bat feces as an indoor allergen. J. Invest. Allergol. Clin. Immunol., 1998; 8: 365-369.
- Alonso A., Mouchián K., Potenza M., Bignone M.L. Neumonitis por hipersensibilidad inducida en cobayos por los antígenos de las heces del murciélago. Allergol et Immunopathol., 2003; 31 (4): 215-220.
- Alonso A., Potenza M., Mouchián K., Albónico J. Proteinase and gelatinolytic properties of a bat feces extract. Allergol et Immunopathol, 2003; 31 (5): 278-281.
- 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 (1): 23-38.
- Berrens L. Antigenic relationship in atopy. II. Cross reactions of anti-house sera with inhalant glycoprotein allergens from different sources. Acta allergol., 1967; 22: 347-352.
- Berrens L. : Estudio controlado sobre la producción de alérgenos en cultivos de *Dermatophagoides pteronyssinus*. Acta allergol., 1975; 30: 390-399.
- Dasgupta A. Common antigenic determinant in extracts of house dust and *Dermatophagoides* spp. Clin.Exp.Immunol., 1970; 6: 891-895.
- Del Rey Calero J. Valoración antigénica de los extractos del ácaro doméstico mediante inmunoprecipitación y fraccionamiento por Sephadex. Allergol et Immunopathol., 1973; 1: 389-393.
- Dische Z. In Methods of Biochemical Analysis. Ed. D.Glick. vol.2: 313, 1955.
- Maunsell L. Mites and house dust allergy in bronchial asthma. Lancet, 1968 ; 1: 1267-1271.
- Mitchell W. House dust mites and insects. Ann.Allergy, 1969; 27: 93-99.
- Miyamoto T. Allergenic identity between the common floor mite (*Dermatophagoides farinae*, Hughes, 1961) and house dust as a causative antigen in bronchial asthma. J. Allergy, 1969; 44: 282-285.
- Olive Perez A. Alérgenos del polvo doméstico. III. Comparación de las respuestas de un extracto de polvo total, de un extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus* y un extracto de polvo desacarinado. Allergol et Immunopathol., 1976; IV: 319-323.
- Pepys J. Mites and house dust allergy. Lancet, 1968; 1: 1270-1272.
- Spieksma F. Comparison of skin reactions to extracts of house dust, mites and human skin scales. Acta Allergol., 1969; 42: 124-128.
- Voorhorst R. Is a mite (*Dermatophagoides* spp) the producer of the house dust allergen? Allerg Asthma, 1964; 10: 329-333.
- Wolfenberger V. The occurrence of antigens of *Dermatophagoides farinae* Hughes in allergenic extracts of house dust. Ann Allergy, 1974; 12: 252-255.
- Woodiel N.L. Allergenic activity of soluble fractions of *Dermatophagoides farinae*. J.Allergy Clin Immunol., 1974; 53: 278-283.
- Senti G. IgE mediated asthma and rhinitis to bat feces and yellow mealworm. Allergy, 2000; 55: 418-419.
- Barret A.J. Classification of peptidases. Meth. Enzymol., 1994; 244: 1-15.
- Bennet B.J. Cloning and sequencing of the group 6 allergen of *Dermatophagoides pteronyssinus*. Clin. Exp. Allergy, 1996; 26: 1150-1154.
- Bradford M.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.
- Cazzulo J.J. Some kinetic properties of a cysteine-proteinase from *Trypanosoma cruzi*. Biochem. Biophys. Acta, 1990; 1037: 186-191.
- Fruconi C. Preparación de extractos alergénicos. En: Alergia Clínica. Hansen K., Werner M. - Salvat, Barcelona, 1970, p. 586.
- Hewitt C.R. Heterogeneous proteolytic specificity and activity of the house dust mite proteinase allergen Der p 1. Clin Exp Allergy, 1997; 27: 201-207.
- Irañeta S., Albónico J., Alonso A. Proteinase and gelatinolytic activities of the house dust mite and cockroach extracts. J. Invest. Allergol. Clin. Immunol., 1999; 9: 235-240.
- King C. : The isolation and characterization of novel collagenolytic serin protease allergen from the dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. J.Allergy Clin Immunol., 1996; 98: 739-747.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970; 227: 680-685.
- Maranon F. Enzymatic methods for the evaluation of the allergenic potency of house dust extracts. J.Allergy Clin. Immunol., 1994; 4: 32-36.
- Stewart G. A comparative study of the three serine proteases from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *farinae*. Allergy, 1997; 27: 201-207.
- Towbin H. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1979 ; 76: 4350-4354.