



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente  
Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Alimentari

EFFETTO DEL TRATTAMENTO TERMICO SULLE PROTEINE  
ALLERGENICHE IN LARVE DI *GALLERIA MELLONELLA*

Relatore  
Prof.ssa Gabriella Pasini  
Correlatore  
Dott. Andrea Antico

Laureando  
Miriam Pettenuzzo  
Matricola n. 1069117

ANNO ACCADEMICO 2014-2015



# INDICE

<b>INDICE</b> .....	<b>3</b>
<b>RIASSUNTO</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1 GALLERIA MELLONELLA</b> .....	<b>11</b>
1.1.1 Gli allergeni di <i>Galleria mellonella</i> .....	15
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b> .....	<b>19</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>21</b>
3.1 MATERIALI .....	21
3.1.1 Campioni .....	21
3.1.2 Caso studio .....	22
3.2 METODI .....	22
3.2.1 Estrazione delle proteine .....	22
3.2.2 Trisglicina SDS-PAGE .....	23
3.2.3 IgE – Immunoblotting .....	23
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	<b>25</b>
4.1 ANALISI QUALITATIVA DEL PATTERN PROTEICO .....	25
4.2 IgE-IMMUNOBLOTTING .....	28
<b>5. CONCLUSIONI</b> .....	<b>33</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>35</b>
<b>SITOGRAFIA</b> .....	<b>37</b>
<b>RINGRAZIAMENTI</b> .....	<b>39</b>



## RIASSUNTO

Tra le allergie respiratorie è nota quella causata dall'esposizione agli insetti, in particolare alle larve utilizzate come esche nella pratica alieutica. Nella pesca alla trota è frequente l'impiego della larva viva o mummificata di *Galleria mellonella*, lepidottero conosciuto anche con il nome di camola del miele e studiato per il suo potere sensibilizzante. Questo lavoro si è occupato di studiare gli allergeni presenti nella forma larvale viva e mummificata di *Galleria mellonella*, allo scopo di valutare gli effetti del trattamento termico di mummificazione sulle proteine allergeniche dell'insetto. Nella prima fase si è proceduto con l'estrazione delle proteine dai campioni con due differenti buffer, al fine di ottimizzare il protocollo di estrazione; in seguito è stato studiato il pattern proteico tramite analisi elettroforetica. La seconda fase del lavoro ha previsto l'individuazione degli allergeni nei due campioni attraverso l'IgE-immunoblotting con il siero di un soggetto monosensibilizzato alla larva, con *skin prick test* positivo sia nei confronti della larva viva, che di quella mummificata.

I risultati ottenuti ci hanno permesso di individuare il metodo di estrazione delle proteine di larva mummificata più efficace, basato sull'utilizzo di un buffer in condizioni fortemente riducenti. Il pattern proteico ottenuto dall'analisi elettroforetica dell'estratto di larva viva risulta ricco e con bande ben definite; lo stesso non si può affermare per l'estratto di larva mummificata, che presenta esclusivamente due bande proteiche ben marcate. Le IgE-seriche del "caso studio" riconoscono proteine sia in *Galleria mellonella* viva che in quella mummificata, anche se in maniera differente, evidenziando che il trattamento termico ha portato ad una modificazione nell'espressione dell'allergenicità. In ogni caso, l'individuazione di un allergene nell'estratto di insetto mummificato è un risultato importante, in quanto non è noto in bibliografia alcun caso di allergia causata dall'esposizione a tale forma larvale.



## ABSTRACT

Exposure to insects is known as a cause of respiratory allergy, particularly to larvae used as bait in fishing practice. In trout fishing is frequent use of live or mummified larvae of the *Galleria mellonella*, also known as the honey moth and studied for its sensitizing power. In this work we were studied allergens present in live or mummified larvae of *Galleria mellonella*, in order to value the effects of the heat treatment of mummification on allergenic proteins of the insect. In the first phase we proceeded with the extraction of proteins from samples with two different buffers, in order to optimize the extraction protocol; then we studied the protein patterns by electrophoretic analysis. In the second phase of the work we examined the recognition of allergens in the two samples by IgE-immunoblotting, using human serum of a monosensitized subject to larva, with positive skin prick test against live and mummified larva.

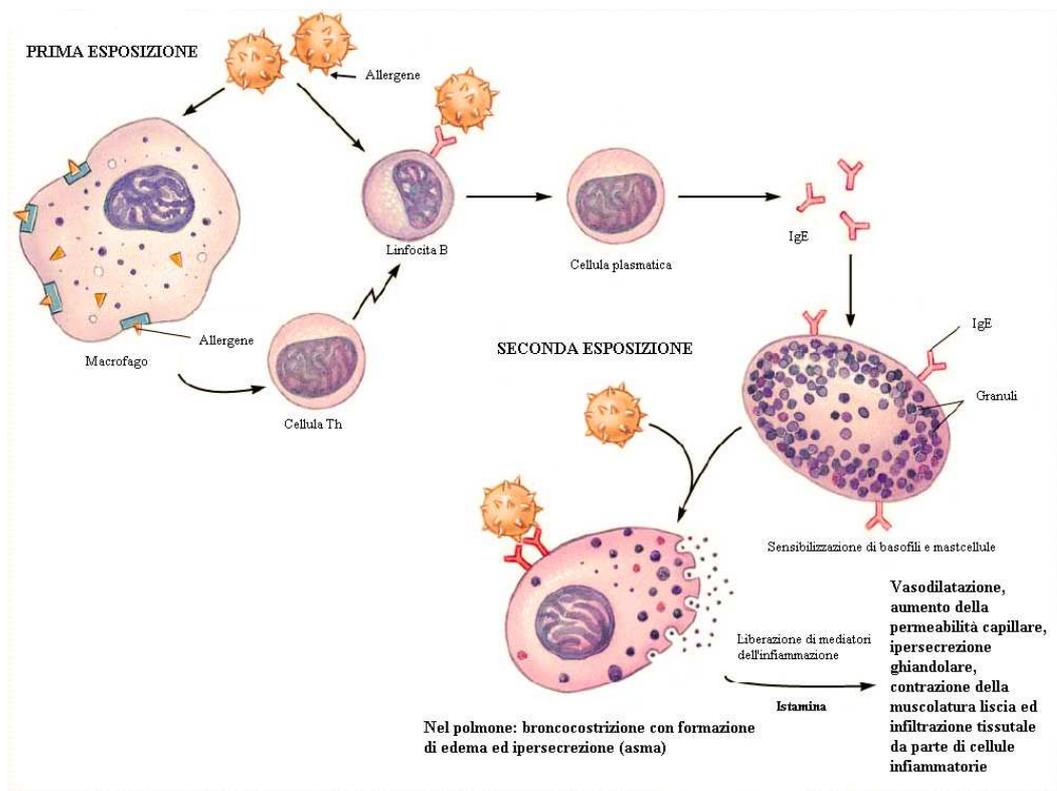
The results obtained have allowed us to identify the more effective method of protein extraction in mummified larvae, based on the use of a buffer in strongly reducing conditions. The electrophoretic pattern of protein obtained from the analysis of the extract of the live larva is rich with well-defined bands; the same can not be said to extract of mummified larva, which has only two well marked protein bands. The serum IgE of the “case study” recognize specific allergens in live and mummified larvae of *Galleria mellonella*, but not in the same way, showing that the heat treatment has modified the expression of allergenicity. However, the identification of an allergen in the extract of mummified insect is an important result, since it is not known in the bibliography any case of allergy caused by exposure to such larval form.



# 1. INTRODUZIONE

Le malattie respiratorie causate dall'esposizione agli insetti sono state descritte oltre tre secoli fa da Bernardino Ramazzini nel suo "*De morbis artificum diatriba*", in cui si afferma la presenza di materiale dannoso, in particolare per i polmoni, in banchi di seta e animali appartenenti allo stesso ordine (Siracusa A. et al., 2003). I vermi e le larve di mosche o di falene sono largamente utilizzati nella pratica alieutica amatoriale e sportiva come esche vive, denominate *live fish bait* (LFB). Studi recenti hanno confermato che l'esposizione alle larve di questi insetti può scatenare reazioni di tipo allergico a carico dell'apparato respiratorio e, in minor misura, della cute, in pescatori e lavoratori impiegati nel loro allevamento (Asero R. et al., 2008). Come noto, l'allergia respiratoria è una malattia del sistema immunitario, definita anche ipersensibilità immediata o di tipo I, in quanto la sintomatologia si manifesta immediatamente dopo il contatto con uno o più allergeni. Si verifica una risposta esagerata o inappropriata del sistema immunitario reattivo, caratterizzata da un'iperproduzione di anticorpi IgE, con conseguente danno ai tessuti coinvolti. Un allergene è quindi una molecola, nella maggior parte dei casi una proteina, in grado di indurre la produzione di anticorpi e legarsi specificatamente con i prodotti finali della risposta immunitaria (anticorpi e/o recettori di superficie dei linfociti T). Il legame avviene attraverso il determinante antigenico, o epitopo, ovvero una o più porzioni di antigene riconoscibili dall'anticorpo. Gli epitopi possono essere continui o discontinui: nel primo caso sono costituiti da una sequenza aminoacidica lineare, nel secondo, invece, gli aminoacidi diventano continui nella struttura terziaria in seguito al ripiegamento tridimensionale della proteina (Shridhar S. K. et al., 2005). Le modificazioni chimiche, fisiche o enzimatiche, causate ad esempio dai trattamenti tecnologico-industriali, possono avere un ruolo fondamentale nell'espressione dell'allergenicità di una proteina. Ad esempio il trattamento termico, in presenza di epitopi discontinui, può denaturare la struttura terziaria della proteina con conseguente diminuzione o soppressione del suo potere allergenico. Lo stesso trattamento termico può invece comportare lo smascheramento di epitopi lineari nascosti, favorendo il cross-linking con le IgE (Ortolani et al., 2001). Per comprendere il legame antigene-anticorpo è quindi fondamentale conoscere la tipologia dei

trattamenti effettuati sul prodotto e come essi influenzano la potenziale allergenicità. Come riassunto nella Figura 1, il legame tra l'antigene e l'anticorpo specifico comporta la liberazione di mediatori dell'infiammazione, come l'istamina, che hanno effetto diretto sui tessuti locali e sono quindi i responsabili delle manifestazioni cliniche. I mediatori provocano vasodilatazione, aumento della permeabilità capillare, ipersecrezione ghiandolare, contrazione della muscolatura liscia ed infiltrazione tissutale da parte di cellule infiammatorie: nel polmone può verificarsi, ad esempio, broncocostrizione con formazione di edema ed ipersecrezione (asma) (Roitt I. et al., 1988).



**Figura 1.** Meccanismo di reazione allergica (I. Roitt et al., 1988).

Un ulteriore aspetto che caratterizza le reazioni di tipo I è il decorso della risposta allergica nel tempo: esse sono caratterizzate da una fase **immediata** e una **tardiva**, ciascuna associata ad una sintomatologia propria, per quanto non facilmente identificabile in tutti i pazienti. Tali fasi possono manifestarsi sia singolarmente, sia in successione. La risposta immediata in genere si verifica entro 5-30 minuti dall'esposizione ad un allergene, mentre la risposta tardiva inizia da 2 a 8 ore dopo. In

fase precoce si manifestano i sintomi causati dal rilascio dei mediatori dell'infiammazione, mentre in fase tardiva avviene il reclutamento di linfociti nel sito di infiammazione, con loro adesione alla parete endoteliale e conseguente rottura dell'epitelio della mucosa (Kumar V. et al., 2013). In caso di asma, ad esempio, nella risposta precoce si verifica un aumento della secrezione della mucosa, edema e broncocostrizione; in seguito, nella risposta tardiva, l'adesione dei leucociti sulla parete endoteliale provoca la rottura dell'epitelio bronchiale, con conseguente attivazione di risposte rigenerative da parte dei tessuti ed il rimodellamento delle vie aeree (Rossi O., 2004). Esiste anche una tipologia di risposta definita **duale**, che consiste nella comparsa immediata dei sintomi, i quali si risolvono in breve tempo, per poi ricomparire dopo alcune ore (Siracusa A. et al., 1994).

## **1.1 GALLERIA MELLONELLA**

*Galleria mellonella* è un insetto terrestre appartenente all'ordine dei Lepidotteri, di piccole dimensioni (15-35 mm di apertura alare), con forma larvale nuda o subnuda e conosciuto anche con il nome di camola del miele, appellativo che deriva dalla sua capacità di infestare le arnie impiegate in apicoltura (Figura 2) (Grandi G., 1951). Le uova dell'insetto vengono infatti depositate in gruppi sui favi o sulle pareti interne delle arnie e, una volta schiuse, le larve si nutrono a spese della cera scavando delle gallerie in cui si costruiscono il bozzolo. In Italia il Lepidottero compie 2 o 3 generazioni l'anno e danneggia i favi non solo perché si nutre della cera, ma anche perché può trasmettere protozoi e batteri dannosi alle api. *Galleria mellonella* è largamente usata nei laboratori entomologici quale ospite di sostituzione per l'allevamento di diversi entomofagi parassiti, ma anche come modello per lo studio del sistema immunitario degli insetti (Masutti L., Zangheri S., 2001). La larva è ampiamente utilizzata come alimento per l'allevamento di anfibi e rettili, in quanto rappresenta una fonte proteica a basso costo. Per lo stesso motivo essa è presente anche nell'alimentazione umana: in Europa, ad esempio, il suo consumo è consentito e diffuso in Belgio ed Olanda; in Italia, invece, l'impiego di questo insetto in ambito alimentare umano non è di uso comune, nonostante non sia attualmente vietato. Da alcuni anni la FAO suggerisce l'inserimento

degli insetti nella dieta, in quanto presentano un elevato contenuto di proteine, (circa il 40%), con un alto valore biologico e buona digeribilità. Altri vantaggi sono il basso costo di produzione ed il ridotto impatto ambientale per il loro allevamento, che risultano molto inferiori a quelli necessari per le tradizionali produzioni zootecniche (Bellucco S., 2009).



**Figura 2.** *Galleria mellonella*: fase larvale e crisalide (www.galleriamellonella.com, 2015)

Il Lepidottero è inoltre molto diffuso nel settore alieutico, dove viene utilizzato nella forma larvale come esca viva per i pesci, soprattutto nella pesca alla trota selvatica e di immissione (trota introdotta dall'uomo in un lago naturale o bacino artificiale), in quanto presenta alcune caratteristiche peculiari, come la colorazione chiara del corpo e l'elevata vitalità, che stimolano il pesce ad abboccare l'amo (www.evofishing.eu, 2015). A questo scopo esistono degli allevamenti specializzati che producono, oltre a *Galleria mellonella*, anche altre larve utilizzate come esche nella pesca, come *Tenebrio molitor* (tarne della farina), *Lucilia caesar* (mosca verde) e *Marphysa sanguinea* (verme marino polichete). L'allevamento delle esche può essere suddiviso in tre fasi: in un primo step le femmine di insetti e vermi sono alimentate e mantenute in ambiente ad alta temperatura, al fine di stimolare la deposizione delle uova. In seguito le uova vengono prelevate e poste in un mezzo ricco in nutrienti, in modo da imitare la cova materna e indurre lo sviluppo delle larve; dopo la schiusa le larve vengono cernite, pulite e confezionate (Siracusa A. et al., 2003).

Per rispondere all'esigenza di prolungare la conservabilità della camola è stata ideata una tecnica di mummificazione che consente di preservare le caratteristiche di appetibilità del bruco vivo, aumentandone inoltre la maneggevolezza (Villalta D. et al., 2004). Le larve di *Galleria mellonella* vengono mummificate attraverso un trattamento

termico ed in seguito vengono confezionate in vasetti di vetro sott'olio o in salamoia. Le modalità con cui viene eseguito il trattamento termico non sono note, in quanto il processo produttivo è protetto da segreto aziendale. Infine, per attrarre maggiormente l'attenzione del pesce durante la pesca, le mummie possono essere anche sbiancate con acqua ossigenata o colorate prima del confezionamento (Figura 3) (www.pescanetwork.it, 2015).



**Figura 3.** Camola del miele mummificata, colorata e conservata sott'olio. (www.pescaplanet.net)

In seguito all'ampia diffusione di *Galleria mellonella* nel settore della pesca, si sono verificati episodi di reazione allergica in soggetti esposti alla larva viva, con manifestazioni a carico dell'apparato respiratorio. Secondo Villalta et al. (2004) i sintomi si verificano in seguito all'esposizione alle sole larve vive, mentre l'utilizzo della forma mummificata, ovvero trattata termicamente, non comporterebbe la manifestazione dell'allergia. Uno studio condotto su 14 soggetti con manifestazioni allergiche associate al contatto con *Lucillia caesar* (LC), *Galleria mellonella* (GM) e *Tenebrio molitor* (TM), ha confermato che i sintomi più diffusi sono quelli respiratori: tutti gli individui esaminati erano, infatti, colpiti da rinocongiuntivite e 13 da asma, mentre solo 3 manifestavano orticaria da contatto (Siracusa A. et al., 1994).

L'allergia colpisce sia gli operatori nel settore dell'allevamento di esche, che i pescatori, con differenze nella manifestazione dei sintomi legate alla durata di esposizione alle larve vive (Asero R. et al., 2007).

Nel caso degli allevatori, essi entrano in contatto con le escrezioni (feci) e le secrezioni (saliva, ormoni) delle larve, le quali rappresentano una possibile fonte di allergeni. È quindi frequente l'insorgenza di reazioni allergiche che potremmo definire di tipo occupazionale, in quanto si manifestano a seguito del contatto con gli allergeni presenti

nell'ambiente di lavoro. Come descritto in precedenza, i sintomi maggiormente diffusi sono la rinocongiuntivite e l'asma, che in questo caso può essere considerato asma professionale (Siracusa A. et al., 2003). L'asma professionale scatenato dal contatto con larve vive di insetti è di tipo immunologico ed immediato, in quanto è legato alla produzione di IgE specifiche ed i sintomi si scatenano entro pochi minuti dall'esposizione all'allergene (Siracusa A. et al., 1994). In uno studio di Siracusa et al. (2003) il 31,6% degli operatori di un allevamento di larve di *Lucilia caesar* (LC), *Galleria mellonella* (GM) e *Tenebrio molitor* (TM) risulta sensibilizzato alle esche vive (*skin prick test* positivi), ma solo il 9,2% dei soggetti esaminati presenta i sintomi. I soggetti asintomatici entravano a contatto per minor tempo con le larve rispetto a quelli sintomatici, per cui la durata dell'esposizione influenza fortemente l'insorgenza della manifestazione allergica.

I pescatori, invece, sempre secondo Siracusa et al., entrando in contatto con le larve sporadicamente e per minor tempo rispetto agli allevatori, manifestano prevalentemente asma tardivo, ovvero che insorge alcune ore dopo l'esposizione all'allergene.

In entrambe le categorie, infine, si sono registrati casi di asma duale, caratterizzato dalla comparsa immediata dei sintomi, i quali si risolvono in breve tempo, ricomparendo dopo alcune ore (Siracusa A. et al., 1994).

Il ruolo dell'atopia (predisposizione geneticamente determinata, quindi spesso familiare, a sviluppare risposte esagerate nei confronti di stimoli o sostanze comunemente innocue) nella sensibilizzazione alle larve vive non è stato ancora del tutto chiarito: nell'articolo di Siracusa et al. (1994) si sottolinea la sua importanza nell'insorgenza dell'allergia, in quanto i soggetti esaminati presentano una stretta correlazione tra manifestazione allergica e iperreattività nei confronti di allergeni comuni. Uno studio condotto successivamente su soggetti impiegati nell'allevamento e nella vendita di esche vive per la pesca, ha invece evidenziato una totale assenza di associazione tra atopia e sensibilizzazione alle larve: in tale caso l'elevata durata di esposizione alle larve degli operatori influisce maggiormente sull'insorgenza dell'allergia, rispetto alla storia clinica dei singoli soggetti (Siracusa A. et al., 2003). Anche in questo caso, quindi, vi è una variazione della risposta allergica in pescatori e operatori, causata dalla differente durata di esposizione alle larve vive.

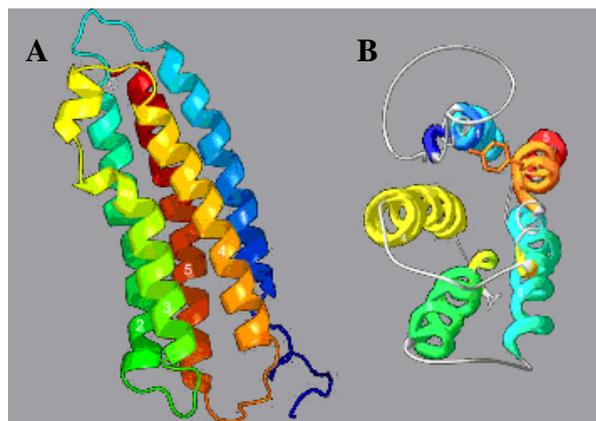
Nonostante l'argomento sia di ampio interesse scientifico, appare attualmente difficile reperire informazioni e dati di prevalenza in merito all'allergia a *Galleria mellonella*, in quanto gli studi sono pochi e spesso condotti su un unico caso clinico.

### 1.1.1 Gli allergeni di *Galleria mellonella*

Lo studio degli allergeni presenti nelle larve di *Galleria mellonella*, così come in altre esche vive utilizzate nella pesca, è stato limitatamente indagato. È noto che la presenza o meno di alcuni allergeni è dipendente dallo stadio larvale, dalla temperatura a cui le larve sono mantenute durante l'allevamento e dagli eventuali trattamenti di mummificazione (Villalta D. et al., 2004). L'allevamento delle esche e la mummificazione non sono processi standardizzati, per cui larve provenienti da allevamenti diversi, o anche dallo stesso allevamento, possono presentare allergeni che differiscono in numero e per la classe proteica di appartenenza. Nel 2004 Villalta et al., tramite immunoblotting con il siero di un soggetto allergico a *Galleria mellonella*, hanno riscontrato nella larva IgE-seriche leganti proteine con peso molecolare compreso tra 20 e 100 kDa, mentre nella larva mummificata non ne sono state rilevate, concludendo che gli allergeni sono proteine termolabili. Tuttavia, in bibliografia i dati in merito non sono omogenei: in un secondo studio, infatti, è risultato che le proteine allergeniche nella larva viva sono esclusivamente due, con peso molecolare di circa 23 e 70 kDa (Asero R. et al., 2007). Un'ulteriore ricerca ha identificato due allergeni a basso peso molecolare, rispettivamente a circa 18 e 24 kDa. Gli allergeni identificati nell'ultimo caso descritto sono stati caratterizzati attraverso spettrometria di massa e successiva comparazione con il database del *National Center for Biotechnology Information*: si tratta in entrambi i casi di proteine dell'emolinfa, in particolare quella a 18 kDa corrisponde ad una alipoproteina, denominata **apolipoforin III**, mentre quella a 24 kDa è un precursore glicoproteico con funzione sconosciuta (Madero M. F. et al., 2007).

L'emolinfa è un fluido del sistema circolatorio di alcuni artropodi, ad esempio ragni, crostacei ed insetti, ma anche di non artropodi come i molluschi; essa circonda le cellule degli organi interni degli animali ed è composta di acqua, sali inorganici ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ) e molecole organiche, principalmente carboidrati, proteine e lipidi. L'emolinfa è coinvolta nel trasporto dell'ossigeno mediante l'emocianina, una proteina

Rame-dipendente, omologa all'emoglobina dei vertebrati; inoltre le proteine e le cellule libere (emociti) presenti nel fluido svolgono un'importante ruolo nel sistema immunitario degli antropodi (Sylvester Fredrick' W., Ravichandran S., 2012). Nella risposta immunitaria sono coinvolte le lipoforine, lipoproteine presenti nell'emolinfa con il compito principale di trasportare i lipidi. Le lipoforine sono legate non covalentemente a lipidi apolari e sono circondate da fosfolipidi e apolipoproteine. Le lipoforine degli insetti sono sempre legate a due apolipoproteine, chiamate apolipoprotein I (P.M. = 250 kDa) e apolipoprotein II (P.M. = 70-80 kDa), mentre una terza apolipoproteina, l'apolipoprotein III, può essere presente o meno (Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M., 2013). La proteina apolipoprotein III è stata ampiamente studiata, in quanto è coinvolta sia nel trasporto dei lipidi, sia nella risposta immunitaria degli insetti: è una proteina globulare, idrosolubile e termostabile. È presente in quantità variabile in tutti gli stadi di sviluppo dell'animale (larva, pupa, adulto ma anche in fluidi della muta) ed il suo peso molecolare è compreso tra i 17 e i 20 kDa a seconda della specie, in particolare in *Galleria mellonella* è pari a 18 kDa (Weise C. et al., 1998). Durante il volo prolungato gli insetti consumano grandi quantità di diacilglicerolo come fonte di energia: l'apolipoprotein III si lega e stabilizza le lipoforine a bassa densità, imputate nel trasporto del diacilglicerolo dal grasso di riserva dell'animale alle cellule dei muscoli deputati al volo (Vasquez L. J. et al., 2009). La struttura primaria dell'apolipoprotein III consiste in 163 aminoacidi, non contiene cisteina, triptofano e metionina (Weise C. et al., 1998), mentre risulta essere ricca in lisina ed arginina (costituiscono circa il 15% degli aminoacidi totali) (Vasquez L. J. et al., 2009). La sua struttura terziaria è rappresentata da un fascio di 5  $\alpha$ -eliche antiparallele legate da corti anelli, con la probabile presenza di un corta elica 3' sulla parte terminale del fascio (Figura 4) (Zixuan S. et al., 2012).



**Figura 4.** Struttura terziaria di apolipopoforin III in *Galleria mellonella*: visione frontale (A) e dall'alto (B) (S. Zixuan et al., 2012).

La proteina risulta termostabile ad un trattamento termico di 90° C per 30 minuti (Wiesner A. et al., 1997). Tale dato è confermato anche da Halwani et al. (1999), i quali affermano, inoltre, che il riscaldamento ed il raffreddamento non portano alla perdita delle sue proprietà fisiologiche. Come descritto nel paragrafo 1.2.1, le proteine dell'emolinfa sono studiate anche per il loro potere allergenico, in quanto risultano responsabili di sintomatologie allergiche a carico dell'apparato respiratorio: in *Galleria mellonella* sono stati individuati due allergeni, corrispondenti all' apolipopoforin III (18kDa) e ad un precursore glicoproteico con funzione sconosciuta (24 kDa) (Madero M. F. et al., 2007). Nonostante Villalta et al. (2004) affermino che l'allergia alle larve di *G. mellonella* sia causata esclusivamente da antigeni termolabili, lo studio di Madero et al. (2007) confuta tali risultati, in quanto individua proprio l'apolipopoforin III come uno degli allergeni. Per questo motivo non si può escludere che l'allergia respiratoria insorga anche a seguito dell'esposizione alla forma mummificata (trattata termicamente) della camola, oltre che alla larva viva.



## 2. SCOPO DELLA TESI

Le larve vive o mummificate di *Galleria mellonella* sono comunemente impiegate come esca nella pesca amatoriale e sportiva. La bibliografia riporta casi di reazioni allergiche in seguito all'esposizione alle larve vive, ma nessuno riferito alle forme larvali mummificate. Il nostro "caso studio" riguarda quindi un soggetto monosensibilizzato a *Galleria mellonella*, *skin prick test* positivo sia alla larva viva che alla larva mummificata (cotta). Lo scopo della ricerca è stato quello di individuare, tramite IgE-immunoblotting, gli allergeni della larva mummificata, valutando un tampone idoneo all'estrazione delle proteine dal campione trattato termicamente, rispetto a quelli estratti dalla larva cruda.



## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 Campioni

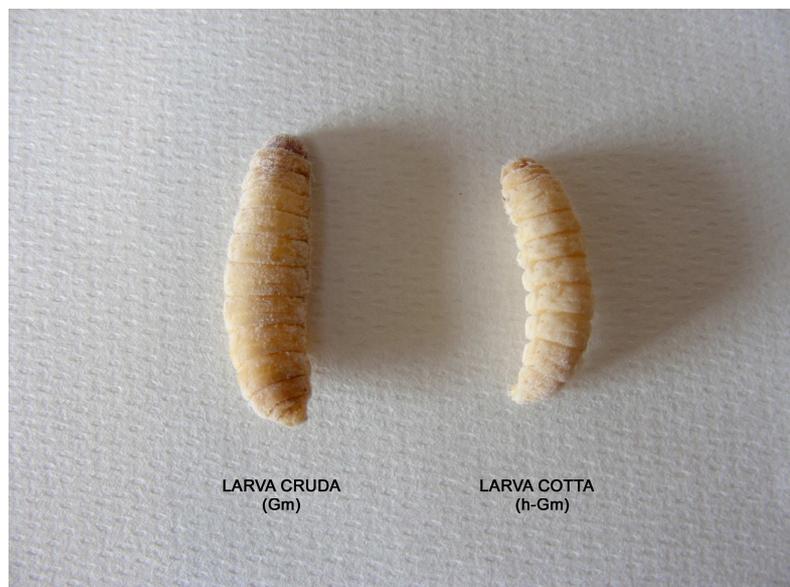
In questo studio è stata presa in considerazione la forma larvale del lepidottero *Galleria mellonella*, comunemente impiegata come esca per la pesca sportiva alla trota.

Nello specifico i campioni erano:

- larve crude (Gm) (Figura 1)
- larve cotte o mummie (h-Gm) (Figura 1)

entrambe reperite presso un negozio specializzato di caccia e pesca. Tutti i campioni erano conservati a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

A causa della riservatezza del processo produttivo, non è stato possibile reperire dall'azienda informazioni specifiche riguardanti le modalità ed i tempi di trattamento termico impiegato per la produzione delle larve cotte (mummificazione).



**Figura 1:** larva di *Galleria mellonella* cruda (Gm) e cotta (h-Gm).

### 3.1.2 Caso studio

Per le prove immunologiche è stato impiegato il siero di un soggetto maschio di 39 anni, pescatore amatoriale, non atopico e monosensibilizzato nei confronti di *Galleria mellonella*, che riferiva la comparsa di rinite ed asma gravi in seguito all'esposizione alle larve crude. I sintomi si manifestavano dopo pochi secondi dal contatto e persistevano per oltre 24 ore. Le caratteristiche cliniche del soggetto "caso studio" sono riportate in Tabella 1.

	Gm	h-Gm
Skin Prick Test	+	+
Test di scatenamento	+	In corso

**Tabella 1:** Caratteristiche cliniche del "caso studio".

## 3.2 METODI

### 3.2.1 Estrazione delle proteine

I campioni di larva Gm e h-Gm ancora congelati sono stati finemente polverizzati in un mortaio in presenza di azoto liquido. I campioni così ottenuti sono stati trattati per estrarre le proteine con due diversi tamponi:

- Tampone A: tampone fosfato salino (PBS) a pH 7,40 contenente 1,46% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (p/v), 0,2% KCl (p/v), 8% NaCl (p/v), 0,2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (p/v), usato in rapporto 1:50 (p/v).
- Tampone B: tampone a pH 9,00 contenente 25 mM di Tris, 192 mM di Glicina, 6 M di Urea, 2,5% SDS (p/v) e 2,5% β-mercaptoetanololo (v/v), usato in rapporto 1:10 p/v.

Per tutti i campioni la fase di estrazione era condotta in agitazione a 4° C per tutta la notte. Infine gli estratti proteici così ottenuti sono stati centrifugati a 14.000 rpm per 1 ora a 20°C; il surnatante limpido ed il pellet sono stati conservati a -20°C.

### **3.2.2 Trisglicina SDS-PAGE**

Le proteine estratte come descritto nel paragrafo 3.1 sono state analizzate in SDS-PAGE. I campioni estratti con il tampone A sono stati diluiti in tampone Laemmli (1,33 M Tris-HCl pH 7,4, 8% SDS (p/v), 40% Glicerolo (p/v)) in rapporto 1:3 (v/v) e addizionati con il 7% di  $\beta$ -mercaptoetanolo, mentre quelli estratti con il tampone B sono stati analizzati direttamente. Per entrambi gli estratti il pellet residuo è stato risospeso in 245  $\mu$ l di tampone Laemmli (Laemmli I. K., 1970) e addizionato con 8  $\mu$ l di  $\beta$ -mercaptoetanolo. Tutti i campioni prima di essere seminati in gel erano bolliti a 100 °C per 5 minuti. Le corse elettroforetiche sono state condotte a 58 mÅ costanti in Trisglicina al 14% di acrilammide (Schägger H. et al., 1987) in Mini Protean II (Bio Rad). Come standard erano impiegate proteine a peso molecolare noto (Prestained SDS-PAGE Standards Bio Rad) costituite da: miosina (205,748 kDa),  $\beta$ -galattosidasi (113,994 kDa), albumina bovina (79,695 kDa), ovalbumina (47,018 kDa), anidrasi carbonica (34,107 kDa), inibitore della tripsina della soia (27,011 kDa), lisozima (17,559 kDa), aprotinina (6,088 kDa). I gel sono stati colorati con Comassie Brilliant Blue R-250 o impiegati per l'immunoblotting (Schägger H. et al., 1987).

### **3.2.3 IgE – Immunoblotting**

Le proteine separate in SDS-PAGE sono state trasferite su membrana di polivinilidenefluoruro (PVDF) 0,2  $\mu$ m (Whatman), impiegando il sistema Semy-dry Trans-blot Turbo (Bio-Rad) applicando 25 Volt costanti per 40 minuti. Per appurare l'avvenuta migrazione delle proteine, le membrane sono state colorate per 4 minuti con una soluzione di Ponceau S, costituita da 0.2% Ponceau S (p/v) in 3% acido tricloroacetico (p/v) e successivamente risciacquate qualche secondo in metanolo. Infine la posizione degli standard molecolari è stata marcata impiegando una soluzione di perossidasi come descritto da Eberini e Pugliesi (1999). Dopo il trasferimento la membrana in PVDF è stata equilibrata in Towbin buffer a pH 9 per 5 minuti e saturata per 2 ore in un tampone costituito da 10% TBS (v/v), 5% latte scremato (p/v) e 0,25% Tween 20 (v/v) (soluzione A). Nella fase successiva la membrana è stata incubata per 12 ore, in agitazione a temperatura ambiente, con il siero del soggetto in esame (anticorpo

primario). Dopo 3 lavaggi di 15 minuti ciascuno con la soluzione A, la membrana è stata incubata per 2 ore con un anticorpo secondario Anti-Human IgE coniugato a perossidasi (Sigma) diluito con la soluzione A in rapporto 1:2000 (v/v). Sono seguiti altri 3 lavaggi da 15 minuti ciascuno con una soluzione di TBS a pH 8,20 costituita da 2,4% Tris (p/v), 8% NaCl (p/v), 0,2% KCl (p/v). La rilevazione dell'attività immunoenzimatica è stata effettuata con il substrato Western Lightning® Ultra (Perkin Elmer) e le immagini sono state acquisite con il sistema ChemiDoc XRS (Bio Rad) ed elaborate con il Software Image Lab.

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

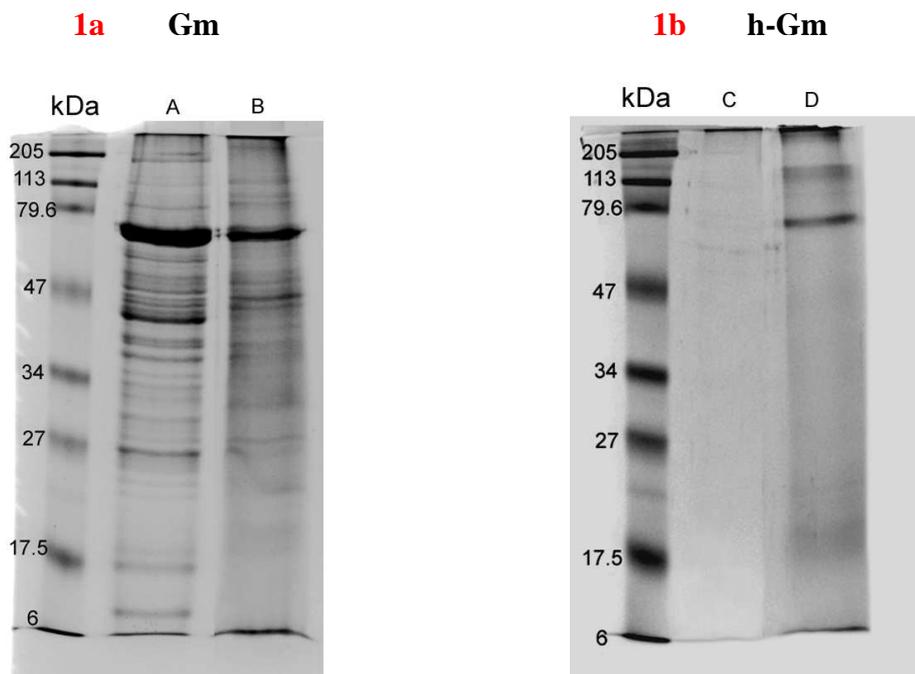
### 4.1 ANALISI QUALITATIVA DEL PATTERN PROTEICO

L'analisi elettroforetica ha permesso di analizzare dal punto di vista qualitativo il pattern proteico degli estratti di larva cruda (**Gm**) e cotta (**h-Gm**) di *Galleria mellonella*.

In questo studio, per estrarre le proteine sono stati utilizzati due diversi tamponi per valutare la differente estraibilità. Il tampone A (come riportato nel capitolo 3) è un buffer salino (PBS) a pH 7,4 comunemente usato, mentre il tampone B è stato da noi formulato e contiene elevate quantità di  $\beta$ -mercaptoetanolo ed urea, capaci di creare forti condizioni riducenti e di aumentare la capacità estrattiva.

La Figura 1a mostra le proteine estratte in PBS di **Gm**. Nello specifico, nel canale A, le proteine del surnatante sono presenti in un range di peso molecolare compreso tra 6 e 80 kDa, con una banda di maggiore intensità a circa 70 kDa. Nello stesso canale, intorno ai 18 kDa, si evidenzia anche un'altra banda che, in base alla sua mobilità elettroforetica, potrebbe corrispondere all'apolipoprotein III, una proteina dell'emolinfa presente in tutti gli stadi larvali dell'insetto, già individuata da Madero et al. (2007). Il canale B mostra invece le proteine non solubili in PBS, estratte dal pellet residuo utilizzando il tampone Laemmli (Laemmli I. K., 1970), dove si possono notare alcune bande, soprattutto ad alto peso molecolare, anche se non chiaramente definite. Tuttavia, anche in questo caso è possibile distinguere una proteina di maggiore intensità a 70 kDa, che presumibilmente per la sua elevata quantità non è stata completamente estratta in PBS e residua ancora nel pellet. Da questo confronto risulta che le proteine della larva cruda di *Galleria mellonella* sono prevalentemente solubili in soluzione salina e quindi quasi completamente estraibili in PBS.

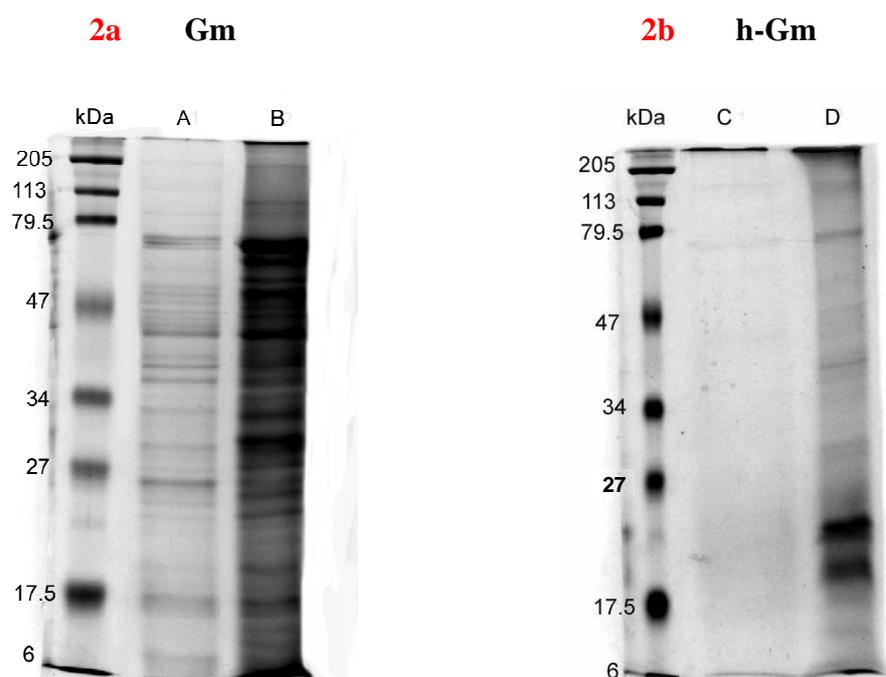
Al contrario, l'impiego di PBS per l'estrazione delle proteine da **h-Gm** (Figura 1b) non si è dimostrato altrettanto efficace, infatti nel surnatante non sono visibili bande proteiche (canale C). Anche l'estrazione del pellet residuo (canale D) mostra solamente bande non ben definite intorno ai 18 kDa e tra 70 e 150 kDa. Da questo si evince che le proteine della larva cotta non sono solubili in PBS, sicuramente a causa della denaturazione che hanno subito durante il trattamento termico di mummificazione.



**Figura 1.** Analisi elettroforetica delle proteine estratte in PBS dalle larve di *Galleria mellonella*. **1a:** Gm (canale A = surnatante, canale B = pellet); **1b:** h-Gm (canale A = surnatante, canale B = pellet).

La Figura 2 mostra i pattern proteici dei surnatanti di **Gm** (2a) e **h-Gm** (2b), ottenuti con i due differenti tamponi di estrazione. Nel canale B l'estratto in tampone B presenta un'elevata densità di bande a range di peso molecolare da 6 a 205 kDa, apparentemente sovrapponibile all'estratto ottenuto con il tampone A (canali A e B). L'efficacia di estrazione del tampone B, in questo caso, sembra ripercuotersi solo sulla quantità e non sulla qualità del pattern proteico.

L'estrazione delle proteine da **h-Gm** con il tampone B risulta invece necessaria, in quanto il PBS non estrae nulla (canale C). Sono infatti visibili due bande molto intense a circa 20 e 25 kDa ed altre più deboli intorno a 12, 25 e 40 kDa (canale D). È inoltre visibile una proteina a circa 70 kDa, che presumibilmente corrisponde alla banda visibile allo stesso peso molecolare negli estratti di larva cruda (Figura 1a, canale A e B).



**Figura 2.** Analisi elettroforetica delle proteine estratte in PBS ed in tampone contenente  $\beta$ -mercaptoetanolo ed urea dalle larve di *Galleria mellonella*. **2a:** Gm (canale A = estratto in tampone A (PBS), canale B = estratto in tampone B); **2b:** h-Gm (canale A = estratto in tampone A (PBS), canale B = estratto in tampone B).

In conclusione, confrontando la diversa estraibilità delle proteine con i due tamponi, si evidenzia che:

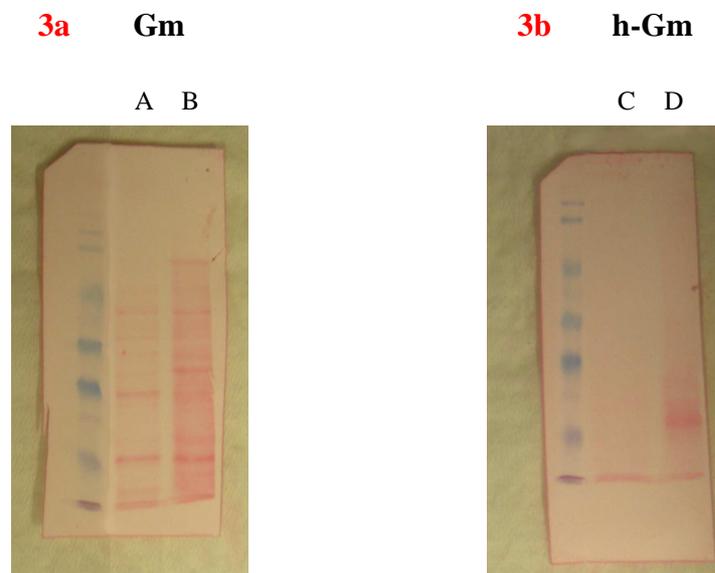
- l'impiego del tampone A (PBS) è maggiormente indicato nell'estrazione delle proteine dei soli campioni di larva cruda di *Galleria mellonella*, in quanto fornisce un profilo proteico più nitido rispetto all'estratto in tampone B, confermando i dati presenti in bibliografia (Villalta D. et al., 2004);
- l'impiego del tampone A (PBS) per estrarre le proteine dai campioni di larva cotta, risulta invece completamente inadeguato, anche se Villalta et al. (2004) individuano due proteine principali a 38 e 77 kDa e circa 15 deboli bande tra 12 e 133 kDa. Questa difformità di risultati potrebbe essere causata dalla variabilità dei trattamenti tecnologici subiti dalle larve di *Galleria mellonella*, analizzate nei lavori attualmente disponibili. Le condizioni di tempo e temperatura applicate per il processo di mummificazione, infatti, non sono note e potrebbero variare in base all'allevamento di produzione, influenzando la frazione proteica estraibile;

- l'impiego del tampone B è invece necessario per estrarre le proteine di larva cotta, perché il trattamento termico da esse subito per il processo di mummificazione le ha rese insolubili. È noto, infatti, che il calore può provocare modificazioni delle proteine, anche in relazione all'intensità del trattamento stesso (ad esempio denaturazione e aggregazione) (Mills. C. et al., 2009). Di conseguenza l'impiego di un tampone contenente sostanze denaturanti ed estraenti risulta indispensabile.

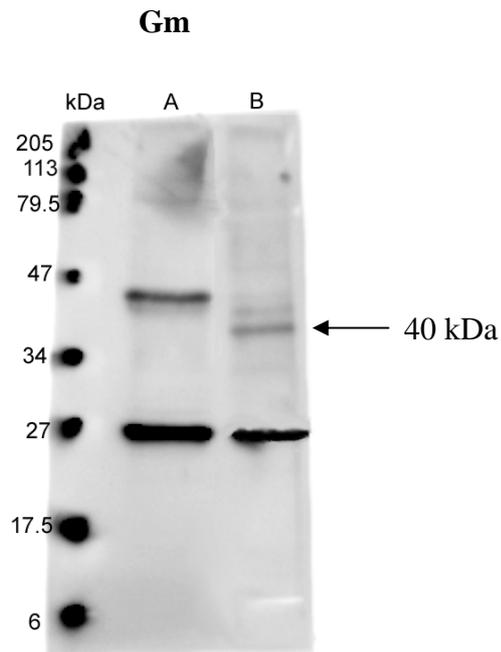
## 4.2 IgE-IMMUNOBLOTTING

Considerando il nostro “caso studio”, rappresentato da un paziente monosensibilizzato a *Galleria mellonella*, con *skin prick test* positivo alla larva cruda e a quella mummificata, abbiamo valutato la capacità delle IgE-seriche a legarsi alle proteine dei nostri estratti.

Per verificare il corretto trasferimento delle proteine sulle membrane da blotting, le stesse sono state colorate con una soluzione di Ponceau S. Come riportato in Figura 3, si può notare che il trasferimento è avvenuto in modo corretto e totale.

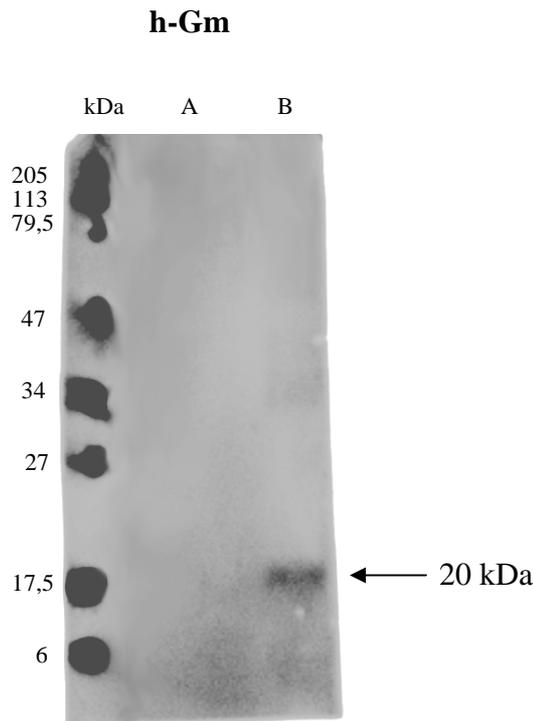


**Figura 3:** Membrane in PVDF colorate con Ponceau S dopo il trasferimento delle proteine. **3a:** Gm (canale A = estratto in tampone A (PBS), canale B = estratto in tampone B); **3b:** h-Gm (canale A = estratto in tampone A (PBS), canale B = estratto in tampone B).



**Figura 4:** IgE-Immunoblotting con siero di soggetto monosensibilizzato a *Galleria mellonella* su estratti di Gm. Canale A = estratto in tampone A (PBS); canale B = estratto in tampone B.

I risultati dell'IgE-immunoblotting con gli estratti ottenuti in PBS e tampone B di **Gm** sono mostrati in Figura 4: nel canale A sono riconosciute due proteine estratte in PBS, con peso molecolare corrispondente a 27 e 45 kDa. Anche nell'estratto in tampone B (canale B) è riconosciuta la banda a 27 kDa e, seppur in maniera meno intensa, è visibile anche una proteina a circa 40 kDa.



**Figura 5:** Immunoblotting con siero di soggetto monosensibilizzato a *Galleria mellonella* su estratti di h-Gm. Canale A = estratto in tampone A (PBS); canale B = estratto in tampone B.

In Figura 5, invece, è riportato lo sviluppo dell'IgE-immunoblotting con l'estratto di **h-Gm**. Nel canale B dell'estratto in tampone B è riconosciuta un'unica proteina a circa 20 kDa; al contrario, nell'estratto in PBS non si riscontra alcun legame IgE-proteina (canale A).

In conclusione, dagli IgE-immunoblotting con gli estratti di larva cruda e cotta di *Galleria mellonella*, si evince che:

- negli estratti di **Gm** viene riconosciuta una proteina a 27 kDa, che risulta solubile sia in tampone A che in tampone B; secondo Madero et al. (2007) uno degli allergeni presenti nella larva cruda di *Galleria mellonella* è una proteina sconosciuta a 24 kDa che potrebbe corrispondere a quella da noi individuata;
- negli estratti in tampone B di **Gm** viene riconosciuta una proteina a 40 kDa, che potrebbe corrispondere ad un allergene non solubile in PBS. Non è da escludere, però, che possa trattarsi anche della stessa proteina riconosciuta nell'estratto in

PBS a 45 kDa, con mobilità elettroforetica modificata dall'elevato effetto riducente del tampone B;

- gli estratti in PBS di **h-Gm** non evidenziano alcun legame con le IgE-seriche del nostro paziente, confermando quanto affermato nello studio di Villalta et al. (2004);
- le proteine a 27 e 40 kDa, riconosciute nell'estratto in tampone B di **Gm**, non sono visibili nell'estratto in **h-Gm**; si può ipotizzare che le proteine in questione presentino uno o più epitopi conformazionali e che il trattamento termico di mummificazione rompa la loro struttura, impedendone il legame con le IgE-seriche;
- tuttavia, nell'estratto in tampone B di **h-Gm** è riconosciuto un allergene a 20 kDa, non visibile nell'estratto in **Gm**. In questo caso il trattamento termico di mummificazione potrebbe aver denaturato la proteina, causando lo smascheramento di uno o più epitopi lineari.



## 5. CONCLUSIONI

Grazie alla collaborazione con il Dottor Andrea Antico, allergologo presso l’Ospedale di Mantova, abbiamo potuto valutare un singolare “caso studio”. Si tratta di un soggetto maschio, di 39 anni di età, praticante la pesca amatoriale, che si è recato in ospedale a seguito di una importante sintomatologia respiratoria (asma e rinocongiuntivite) dopo aver manipolato le esche vive di *Galleria mellonella*, utilizzate per la pesca all’amo. I test diagnostici (*skin prick test*) hanno evidenziato una patologia allergica, risultando positivi sia nei confronti dell’estratto di larva viva (già nota in bibliografia), sia all’estratto di larva mummificata (trattata termicamente), mai citata in bibliografia. Per questo ultimo risultato, che rappresenta l’originalità del caso, sono state estratte tutte le proteine dalla larva mummificata ed è stata individuata una proteina legante le IgE-seriche.

Nonostante il test di scatenamento con la larva mummificata sia ancora in corso, il soggetto in esame risulta comunque monosensibilizzato ad essa, confermando sicuramente uno stato di “preallergia”

Interessante, a completamento del lavoro, sarebbe indagare sulla natura della proteina legante le IgE-seriche, tramite una identificazione per via spettrometrica.



## BIBLIOGRAFIA

- Asero R., Mistrello G., Roncarolo D., Amato S. 2007. Respiratory and skin allergy to *Galleria mellonella* (Bee moth). International Archives of Allergy and Immunology n. 145:340-342
- Bellucco S. 2009. Insetti per uso alimentare umano: aspetti nutrizionali e igienico-sanitari. Università degli Studi di Padova, Facoltà di Medicina Veterinaria 1-53
- Eberini I. e Pugliesi L. 1999. Marking nitrocellulose membranes by peroxidase spotting. Electrophoresis n. 20:491-492
- Grandi G. 1951. Introduzione allo studio dell'Entomologia. Edizioni Agricole 456-458
- Halwani E., Dunphy G. B. 1999. Apolipoprotein III in *Galleria mellonella* potentiates hemolympholytic activity. Developmental & Comparative Immunology n. 23:563-570
- Kumar V., Abbas A. K., Aster J.C. 2013. Robbins - Fondamenti di Patologia e di fisiopatologia. Masson – Edra 109-111
- Laemmli I. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature n. 227:670
- Madero M. F., Enríquez-Matas A., Fernández-Nieto M., Sastre B., Del Pozo V., Pastor C., Quirce S., Sastre J. 2007. Characterization of allergens from the fish bait *Galleria mellonella*. Journal of Allergy and Clinical Immunology vol. 119, n. 4:1021-1022

- Masutti L., Zangheri S. 2001. Entomologia Generale e applicata. CEDAM 664-666
- Mills C. E. N., Sancho A. I., Rigby N., Jenkins J. A., Mackie A. R. 2009. Molecular Nutrition & Food Research n. 53(8):963-969
- Ortolani C., Ispano M., Scibilia J., Pastorello E. A. 2001. Introducing chemistry to food allergy. J Allergy n. 56:5-8
- Roitt I., Brostoff J., Male D. 1988. Immunologia. USES – Edizioni Scientifiche Firenze
- Rossi O. 2004. L'asma bronchiale. SEE – Editrice Firenze 51-74
- Schägger H., Jagow G. V. 1987. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. Analytical Biochemistry n. 166:368-379
- Shridhar S. K., Teuber S. S., Roux K. H. 2005. Effects of food processing on the stability of food allergens. Biotechnology advances n. 23:423-429
- Siracusa A., Bettini P., Bacocoli R., Severini C., Verga A., Abbritti G. 1994. Asthma caused by live fish bait. Journal of Allergy and Clinical Immunology vol. 93, n.2:424-430
- Siracusa A., Marcucci F., Spinozzi F., Marabini A., Pettinari L., Pace M. L., Tacconi C. 2003. Prevalence of occupational allergy due to live fish bait. Clinical & Experimental Allergy n. 33:507-510
- Sylvester Fredrick' W., Ravichandran S. 2012. Hemolymph proteins in marine crustaceans. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine n. 2(6):496–502

- Terzano C. 2008. Malattie dell'apparato respiratorio. Springer Science & Business Media 343-345
- Vasquez L. J., Abdullahi G. E., Wan C. L., Weers P. M. M. 2009. Apolipoprotein III lysine modification: effect on the structure and lipid binding. *Biochimica et Biophysica Acta* n. 1788:1901-1906
- Villalta D., Martelli P., Mistrello G., Roncarolo D., Zanoni D. 2004. Bee moth (*Galleria mellonella*) allergic reactions are caused by several thermolabile antigens. *Allergy* n. 59:1002-1005
- Weise C., Franke P., Kopáček P., Wiesner A. 1998. Primary structure of apolipoprotein III from the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Protein Chemistry* vol. 17 n. 7
- Wiesner A., Losen S., Kopáček P., Weise C., Gotz P. 1997. Isolated Apolipoprotein III from *Galleria mellonella* stimulated the immune reactions of this insects. *Journal of Insect Physiology* vol. 43, n. 4:383-391
- Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M. 2013. Apolipoproteins and insects immune response. *Information Systems Journal* n. 10:58-68
- Zixuan S., Junfeng Y., Wenjing W., Guren Z. 2012. Molecular Characterization and gene expression of apolipoprotein III from the ghost moth, *Thitarodes pui* (Lepidoptera, Hepialidae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* vol. 80, n. 1:1-14

## **SITOGRAFIA**

- [www.galleriamellonella.com](http://www.galleriamellonella.com). 2015
- [www.evofishing.eu](http://www.evofishing.eu). 2015
- [www.pescanetwork.it](http://www.pescanetwork.it). 2015
- [www.pescaplanet.net](http://www.pescaplanet.net). 2015



## **RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio la Prof.ssa Gabriella Pasini per la disponibilità e la professionalità dimostrate durante l'intero percorso di Laurea.

Ringrazio il Dott. Andrea Antico per il supporto scientifico fornitomi in merito alla presente tesi.

Un particolare ringraziamento va alla Dott.ssa Mara Vegro, per avermi guidata e sostenuta nel lavoro, per aver condiviso conoscenze e sorrisi.

Infine, ringrazio la mia famiglia per il supporto morale offertomi e per le energie investite in tutti gli anni di studio.

Miriam Pettenuzzo