

Caracterización de la actividad alérgica y enzimática de extractos somáticos producidos a partir de cultivos *in vitro* del ácaro *Dermatophagoides farinae*

Characterization of the allergenic and enzymatic activity of somatic extracts obtained from *in vitro* cultures of the indoor mite *Dermatophagoides farinae*

Dary Luz Mendoza Meza¹, Tatiana Ruiz Afanador², Alfredo Lagares Guzmán³, Gloria Garavito de Egea³, Eduardo Egea Bermejo³

Resumen

Introducción: El *Dermatophagoides farinae* (DF) es un ácaro cosmopolita presente en el polvo intradomiciliario. Este ácaro es fuente importante de alérgenos desencadenantes de asma y rinitis alérgica.

Objetivo: El propósito de este trabajo fue la producción y caracterización de extractos alérgicos para uso en diagnóstico alergológico y terapia.

Métodos: Los extractos se prepararon a partir de cultivos puros *in vitro* de ácaros. Las proteínas del ácaro fueron extraídas mediante lisis osmótica. La concentración de proteínas se determinó por microensayo de Bradford y el perfil electroforético fue identificado por SDS-PAGE. La actividad enzimática fue evaluada con el estuche comercial Api Zym (Biomérieux®) y la actividad alérgica por inmunoensayo de Dot Blot.

Resultados: Se prepararon cinco lotes de extractos. La media del peso seco de material extraído fue 37,04 mg/gramo de ácaros (DE= 11,3) y la media de la cantidad de proteína fue 212,4 µg/mg de peso seco (DE= 33,3). El perfil SDS-PAGE mostró la presencia de 8 bandas comunes (21-109 kDa). Todos los extractos presentaron actividad enzimática hidrolasa. También se demostró actividad tripsina, alfa-amilasa y alfa-quimiotripsina, correspondientes a los alérgenos de los ácaros del grupo 3, 4 y 6 respectivamente. Todos los extractos tuvieron proteínas con capacidad de unión a los anticuerpos IgE.

Conclusión: Aquí presentamos la producción de extractos del ácaro DF, con actividad alérgica. Estos resultados fundamentarán la producción a escala de extractos alérgicos de ácaros desencadenantes de enfermedades alérgicas en el humano, con fines diagnósticos y de aplicación terapéutica.

Palabras clave: Ácaros, extractos, alérgenos, actividad enzimática.

¹ Grupo de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Medicina, Universidad del Magdalena. Santa Marta (Colombia). dary_mendoza@yahoo.com

² Grupo de Inmunología y Biología Molecular, Santa Marta (Colombia). Facultad de Química y Farmacia, Universidad del Atlántico. Barranquilla (Colombia).

³ Grupo de Investigación en Inmunología y Biología Molecular, Universidad del Norte. Barranquilla (Colombia).

Correspondencia: Universidad del Magdalena, Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Medicina. Carrera 32 n° 22-08, San Pedro Alejandrino. Teléfono: 4301292. dary_mendoza@yahoo.com

Fecha de recepción: 17 de noviembre de 2010
Fecha de aceptación: 9 de abril de 2011

Salud Uninorte

Vol. 27, N° 1, 2011
ISSN 0120-5552

Abstract

Introduction: *Dermatophagoides farinae* (DF) is a cosmopolitan mite present in the indoor house dust. This mite is an important source of aeroallergens triggering of allergic asthma and rhinitis. The purpose of the present study was the production, and immunochemical and enzymatic characterization of allergenic extracts for use in allergologic diagnosis and therapy.

Materials and methods: DF somatic extracts were prepared from pure *In vitro* culture of the mite from Santa Marta mite fauna, a Caribbean Colombian City. Mite proteins were extracted by osmotic lysis with 0.1 M of NH_4HCO_3 buffer. The soluble proteins were separated of the cellular debris by centrifugation, dialysis and filtration. Proteins concentration was measured by the Bradford microassay test and the electrophoretic profile was identified by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The enzymatic activity was evaluated with the commercial Kit, Api Zym (Biomeriux®). A Dot blot immunoassay was done in order to evaluate allergenic activity of the extracts.

Results: Five lots of DF somatic extracts were prepared. The average of dry weight material extract was 37.04 mg/g of mites (SD= 11.3) and the average of total protein obtained was 212.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry weight (SD= 33.3). The SDS-PAGE profile showed 8 common bands (21-109 kDa). All extracts presented enzymatic activity, esterase (C4), esterase lipase, alkaline phosphatase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, leucine and valine arylamidase, beta-glucosidase, N-acetyl-beta-glucosaminidase and alpha-mannosidase. Furthermore, enzymatic activity for trypsin, alpha-amylase and alpha-chymotrypsin, corresponding to the mites allergen groups 3, 4 and 6, respectively, was demonstrated. All somatic DF extracts have IgE antibody binding proteins.

Conclusions: We report the production of somatic extracts DF, with allergenic activity. Mite cultures in the exponential growth phase expressed the major mite allergens, trypsin, alpha-amylase and alpha-chymotrypsin. These results would be the base for the scale production of allergenic extracts of mites responsible for the induction of human allergic diseases, useful for diagnostic and therapeutic applications.

Key words: *Dermatophagoides farinae*, somatic extracts, allergens, enzymatic activity.

INTRODUCCIÓN

Los ácaros del género *Dermatophagoides*, presentes en el polvo intradomiciliario, son la fuente principal de aéreo-alérgenos sensibilizantes y desencadenantes de los síntomas y signos en enfermedades alérgicas de las vías respiratorias tanto en niños como en adultos (1-3). Las especies *Dermatophagoides farinae* (DF) y *Dermatophagoides pteronnyssinus* están ampliamente distribuidas en países ubicados en el cinturón tropical (4-4) y habitan en el polvo de ambientes intramuros, alimentándose principalmente de es-

camas de piel y fómites de origen humano y animal (6).

En la región Caribe colombiana, las condiciones climáticas son favorables para el crecimiento de los DF, durante gran parte del año, aumentando el tiempo de exposición a sus alérgenos, y en consecuencia, la tasa de incidencia de alergias respiratorias (7-8). El DF es uno de los ácaros mayoritarios en el polvo de habitación en esta región (9-10). Se acepta entonces que un alto porcentaje de los pacientes alérgicos posee anticuerpos IgE específicos contra los

alérgenos del grupo 1 de esos ácaros (Figura 1) (11). Se estima que la exposición a 2 µg de Der f 1 es factor de riesgo para producir sensibilización en individuos atópicos (12). El potencial inmunogénico del Der f1 parece estar relacionado con su actividad biológica y enzimática. El alérgeno DEF1 es una cisteína proteínasa presente en las heces y el tracto gastrointestinal del ácaro, la cual puede catalizar la ruptura hidrolítica de las barreras de defensa del sistema respiratorio humano, facilitando su propia entrada a la vía aérea, donde podría estimular la cascada inflamatoria alérgica (13-15). En total se han caracterizado 13 alérgenos del DF, algunos de ellos con actividad enzimática hidrolasa, incluidos en los grupos 1, 3, 4, 6, 8, 9 y 15 (16-17).

Los extractos alérgenos de ácaros intradomiciliarios son productos biológicos utilizados en el diagnóstico *in vitro* e *in vivo* de la sensibilización que se presenta en pacientes alérgicos. También se utilizan en investigación clínica y desarrollo tecnológico (18-19) como reactantes y dispositivos para el monitoreo y control ambiental de los ácaros (20-21). Químicamente, son definidos como mezclas complejas de proteínas de composición bioquímica y actividad biológica variable, que pueden estar influenciadas, entre otras variables, por el origen geográfico de los ácaros, las condiciones biofísicas de sus cultivos, el estadio de desarrollo y los métodos de obtención y purificación de los extractos. Uno de los aspectos más críticos en la producción de extractos alérgenos es su heterogeneidad; por esto se debe disponer de pruebas que determinen en gran medida la presencia y concentración de los alérgenos mayores en la fuente alérgica (22-24).

El propósito de este trabajo fue producir y caracterizar inmuoquímicamente extrac-

tos alérgenos de DF provenientes de un cultivo puro *in vitro* de ácaros procedentes de la ácaro-fauna de Santa Marta, ciudad del Caribe colombiano, y evaluar su actividad enzimática con fines de aplicaciones biomédicas y en proyectos de desarrollo tecnológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ácaros



Fuente: Imagen tomada de un cultivo *in vitro* establecido en el Laboratorio de Bioquímica de la Universidad del Magdalena.

Figura 1. Ácaro *D. farinae*

Los ácaros utilizados en este estudio provinieron de cultivos puros de DF establecidos desde noviembre de 2007 a partir de ácaros colectados en los ecosistemas intramuros de personas con diagnóstico clínico de asma bronquial alérgica en la zona urbana del distrito de Santa Marta. Los ácaros fueron identificados con las claves taxonómicas de Colloff y Spierman (25), cultivados en la oscuridad, a temperatura promedio de 28° C y con una humedad relativa entre 55-65% (26-29). Como medio nutritivo para los

ácaros se usó una combinación de harina de pescado y levadura seca, relación de peso 1:1. Los cultivos se renovaron cada 120 días a partir de 300 ácaros adultos, entre hembras y machos (ver Figuras 1 y 2).

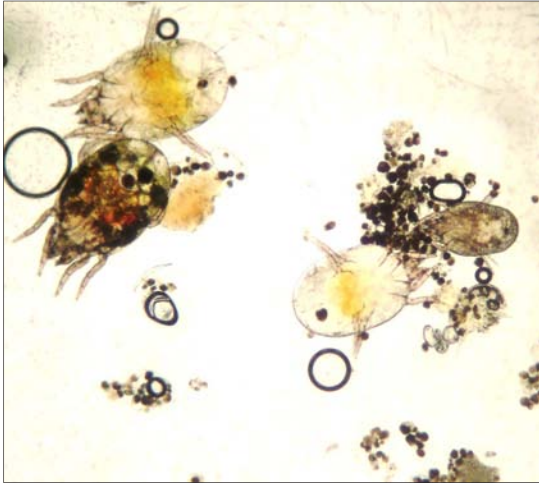


Figura 2. Ácaros *D. farinae* y partículas fecales

Extracción de proteínas

Se utilizaron cultivos puros de DF con un periodo de cultivo entre 72 y 120 días. Los ácaros se separaron del medio de cultivo a través del método modificado de Tullgren (30). Un gramo de ácaros fue deslipidado en un extractor Soxhlet, usando éter etílico. Las proteínas solubles de los ácaros fueron extraídas con NH_4HCO_3 0,1M durante 24 horas a 4°C y agitación constante; luego fueron separadas de los restos celulares por centrifugación a 5000 rpm por 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron dializados durante 16 horas a 4°C, en membranas con tamaño de exclusión de 3500 Dalton (Spectrum Laboratories Inc), frente a agua purificada con un sistema Milli-Q (Millipore, India) con una conductividad > 15 MW/cm. Los extractos dializados fueron liofilizados hasta sequedad en un equipo LABCONCO® FreeZone™, a temperatura

constante de - 40°C y presión de vacío de 0,133 mBar. Los productos liofilizados se almacenaron en viales cerrados herméticamente a -20°C hasta la realización de las pruebas de caracterización bioquímica e inmunológica.

Cuantificación de proteínas totales

El material liofilizado fue utilizado para determinar la cantidad de proteínas liberadas durante la extracción y el peso seco. Las proteínas se cuantificaron por el microensayo de Bradford (Bio-Rad protein Assay, Hercules, CA). Se construyó una curva patrón partir de diluciones seriadas de BSA (mg/mL). Un volumen de 4 µL de cada dilución de BSA y de los extractos se mezcló con 196 µL del reactivo de Bradford (dilución acuosa 1/5), y a continuación se leyó la densidad óptica (DO) a longitud de onda de 620 nm usando el *software* Gen5™ Data Analysis (BioTek® Instruments, Inc). La concentración de proteínas de los extractos se calculó extrapolando su DO en la curva patrón de BSA (31). Tanto los patrones de BSA como los extractos se procesaron por triplicado.

SDS- PAGE

El perfil electroforético de proteínas de cada extracto se evaluó por SDS-PAGE usando un equipo Mini Protean® III cell (Bio Rad). Se prepararon geles de poliacrilamida de concentración 12%T y 4%C. Se sembraron 20 µg de extracto por pozo; el corrido electroforético se hizo a 120 V por 2 horas. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 durante 2 horas para ser visualizados en el fotodocumentador (Universal Hood II, Serie n° 76S/7786); el tamaño de las bandas mayoritarias fue calculado con el software Quantity One de Bio-Rad.

Perfil enzimático hidrolasa de los extractos

Se evaluó la actividad enzimática de los extractos a 19 sustratos de hidrolasas usando la prueba semicuantitativa Api Zym (Bio Mèriux S.A France, Lyon). Cada extracto se diluyó con tampón TBS 1X hasta concentración de 1 mg/mL; se agregó 65 µL de éste a las cúpulas de reacción del Api Zym, los cuales contienen los sustratos para las 19 hidrolasas y un control negativo de la prueba. La reacción se incubó por 5 horas a 37°C, seguido se agregó a cada cúpula una gota de reactivo Zym A y otra de Zym B. Los resultados se interpretaron siguiendo el instructivo de la casa comercial.

Evaluación de las propiedades alérgicas de los extractos

Con el propósito de evaluar la respuesta de unión a IgE de los extractos somáticos de proteínas del DF se realizó un inmunoensayo de Dot Blot. Para el desarrollo de las pruebas se utilizó un grupo (*pool*) de sueros positivos provenientes de cinco individuos alérgicos con diagnóstico clínico de asma bronquial leve persistente y/o rinitis alérgica, cuyos niveles de IgE total fueron mayores a 250 UI/mL. En todos se detectó y semicuantificó IgE específica anti-Dermatophagoides sp.; fueron seleccionados aquellos sueros con niveles mayores a 0,37 UI/mL; para ello se usó un ensayo de ELISA indirecto con el estuche comercial RIDASCREEN® specific IgE (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany). Como control negativo se usó un *pool* de sueros provenientes de individuos clínicamente normales, sin antecedentes personales ni familiares de enfermedades alérgicas, a los cuales se les pudo confirmar la ausencia de IgE alérgeno específica a Dermatophagoides sp. (RIDAS-

CREEN anti-Dermatophagoides sp menor a 0,37 UI/mL). Todas los individuos que participaron en la donación de sus sueros firmaron un consentimiento informado, previa explicación de los objetivos de la investigación, sus ventajas y exposición con riesgo mínimo, según lo establecido en la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de la Protección Social de Colombia.

Dot Blot

Para el desarrollo de la prueba se prepararon diluciones de los extractos a concentraciones de 250 -125 - 62,5 - 31,2 -15,6 y 7,81 µg/mL, en buffer Tris-NaCl (TBS). Un volumen de 50 µL de cada dilución se adsorbió a membranas de nitrocelulosa usando un equipo de microfiltración Bio - Dot® SF (Bio Rad), durante 2 horas. La membrana se bloqueó en solución TBST-BSA (TBS 50 mM, Tween 20 al 0,1% v/v y BSA 3% p/v) durante 1 h. A continuación se incubó con una dilución 1/5 del *pool* de 5 sueros sanguíneos en tampón TBST-BSA; la incubación se realizó durante 16 horas a 4°C. Luego se lavó la membrana tres veces con tampón TBST y se incubó 1 h con una dilución 1/1000 en tampón TBST-BSA del conjugado, anti-IgE humana unida a la fosfatasa alcalina (Biosure International). El conjugado no unido se removió con tres lavados de 10 min cada uno con tampón TBST. El revelado de la membrana se hizo con 5 mL del sustrato compuesto NBT/BCIP disuelto en tampón de la fosfatasa alcalina. El color de las bandas se detectó a los 5 minutos, después de que la reacción se detuvo con solución de TBS 1X, EDTA 2 mM.

Análisis de los datos

Los datos obtenidos se organizaron y sistematizaron en el programa Excel de Microsoft

Windows Vista™. Para el tratamiento estadístico se utilizaron medidas de frecuencia, pruebas de tendencia central y dispersión.

RESULTADOS

Producción de extractos somáticos de DF

Se produjeron 5 lotes de extractos de proteínas de cuerpo entero (somáticos) del DF. La cantidad de material seco obtenido estuvo entre 24,96 y 50,8 mg/g de ácaros libres de medio de cultivo (Media=37,04; DE=1,3); el contenido de proteína estuvo entre 168 y 246 µg/mg del material liofilizado (Media=212,4; DE=33,3) (ver Tabla 1).

Tabla 1

Productividad en la extracción de proteínas somáticas solubles del *D. farinae*

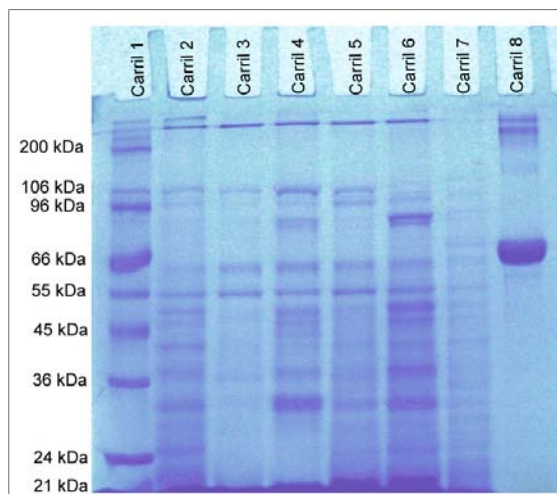
Lote Extracto	Días de cultivo	Peso seco de extracto (mg)	Concentración proteína (mg/mL)	µg de proteína/mg de material liofilizado
A1	72	40,57	1,684	168
A2	80	43,08	2,021	190
A3	96	50,8	2,316	217
A4	114	24,96	2,646	241
A5	120	25,8	2,646	246

Fuente: Datos tabulados por los autores.

Caracterización del perfil SDS-PAGE

Se identificaron 12 fracciones electroforéticas mayoritarias, entre 20 y 200 kDa. Ocho fracciones electroforéticas fueron comunes en los cinco lotes de extractos, con tamaños de 109, 98, 65, 55, 42, 37, 27 y 21 kDa. Los lotes A1 y A5 presentaron un perfil de bandas electroforéticas más definido en el rango de 20 a 30 kDa, donde están ubicados los alérgenos de mayor importancia clínica, reportados para el ácaro DF. El patrón de bandas observadas en los diferentes lotes

fue muy similar al observado en el extracto comercial (figura 3).



Fuente: Realización propia de los autores.

Figura 3. Perfil electroforético de extractos somáticos del ácaro *D. farinae*. En el carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: Lote A5; carril 3: Lote A4; carril 4: Lote A3; carril 5: Lote A2; carril 6: Lote A1; carril 7: Extracto comercial de *D. farinae*; carril 8: Albúmina sérica bovina.

Evaluación de la actividad enzimática hidrolasa

Los cinco lotes presentaron actividad enzimática a 10 hidrolasas: estereasa, estereasa lipasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, Naftol- AS B1- fosfohidrolasa, leucina y valina arilamidasa, beta-glucosidasa, N-acetil-beta-glucosaminidasa y alfa-manosidasa; esta actividad fue mayor en los lotes A1, A2 y A3 (ver Tabla 2). Estas enzimas desempeñan funciones metabólicas y fisiológicas importantes para el ciclo de vida de los ácaros (32). La enzima N-acetil β-glucosaminidasa, alta en todos los extractos, participa en la hidrólisis de los productos de la digestión del ácido hialurónico, uno de los componentes principales de tejido conectivo; esta enzima se ha encontrado en

concentraciones particularmente elevadas en excretas obtenidas de ácaros saprofitos como el *Dermanyssus gallinae* y *Psoroptes ovis* (33). Las actividades exopeptidasas leucina y valina arilmidasas, detectadas en los cinco extractos, han sido reportadas en el cuerpo de los invertebrados; en los ácaros, participan en la digestión de las proteínas de su dieta, en la muda de las larvas y en la inactivación de neuropéptidos. Otra de las enzimas con actividad particularmente alta fue la fosfatasa ácida; esta se ha localizado en la periferia de las membranas y en los fagolisosomas del mesenterio, dentro del sistema digestivo de los ácaros *Oribatides* (34).

Tabla 2

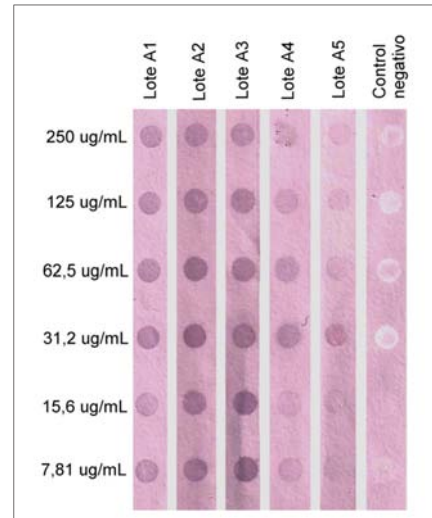
Resultado de actividad enzimática evaluada con el estuche Api Zym. La cantidad de sustrato hidrolizado fue clasificada y comparada con una carta estándar de lectura semicuantitativa. La escala "0" representa 0 nmol, "1"= 5 nmol, "2" = 10 nmol, "3"= 15 nmol, "4"= 20 nmol y "5" ≥ 40 nmol.

n° Pozo	Enzima	Actividad enzimática/ 5 h				
		DFA1	DFA2	DFA3	DFA4	DFA5
1	Control negativo	0	0	0	0	0
2	Fosfatasa alcalina	5	5	5	5	4
3	Estereasa (C4)	3	3	4	4	3
4	Estereasa lipasa (C8)	5	5	5	5	4
5	Lipasa (C14)	1	1	1	0	0
6	Leucina Arilamidasa	5	5	5	5	5
7	Valina Arilamidasa	4	3	3	1	1
8	Cistina Arilamidasa	1	1	1	0	0
9	Tripsina	1	1	3	0	0
10	Alfa- quimi tripsina	0	1	2	0	0
11	Fosfatasa acida	5	5	5	5	5
12	Naftol -AS-B1-Fosfohidrolasa	5	5	4	4	4
13	Alfa -Galactosidasa	1	0	0	0	4
14	Beta- Galactosidasa	2	1	1	1	1
15	Beta- Glucoronidasa	1	0	5	0	1
16	Alfa- Glucosidasa	3	1	5	0	1
17	Beta- Glucosidasa	0	0	1	0	0
18	N- acetil-beta- Glucosaminidasa	1	1	5	0	1
19	Alfa- Manosidasa	5	5	5	5	5
20	Alfa fucosidasa	0	0	0	0	0

Fuente: Datos tabulados por los autores.

Dot Blot

Este ensayo reveló que los cinco lotes de extractos preparados contienen proteínas de unión a la IgE, y los tres primeros (DFA1, DFA2 y DFA3) son los de mayor potencia, definida esta por la intensidad de la señal en el Dot (ver figura 4).



Fuente: Elaboración propia de los autores.

Figura 4. Resultado del Dot blot.

Obsérvese que todos los lotes de extractos somáticos del ácaro *D. farinae* reaccionaron con el pool de 5 sueros sanguíneos de individuos sensibilizados a los *Dermatophagoides* sp. Los lotes A1, A2 y A3 mostraron la mayor reactividad. El control negativo corresponde al lote A3, incubado con un pool de 5 sueros sanguíneos de individuos sin antecedentes de alergia.

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que los extractos A1, A2 y A3 presentan mayor actividad enzimática, que es consistente con el resultado del Dot blot. La mayoría de los alérgenos importantes de *Dermatophagoides* sp. presentan actividad enzimática hidrolasa (35-36). Las enzimas descritas para los ácaros del género *Dermatophagoides*, que son alérgenos, incluyen a la cisteína prote-

asa (alérgeno del grupo 1), tripsina (alérgeno del grupo 3), alfa-amilasa (alérgeno del grupo 4), alfa-quimiotripsina (alérgeno del grupo 6) y quitinasas (alérgeno del grupo 15 y 18) (37-42). las serinas proteasas: tripsina y quimiotripsina se han encontrado en mayor cantidad en los extractos de heces que en extractos somáticos (43-44); sin embargo, experimentos realizados por Eraso y colaboradores con extractos de *D. pteronyssinus* y *D. farinae*, obtenidos a partir de cultivos en fase de latencia, crecimiento exponencial y muerte, demostraron que durante la fase de crecimiento máximo, los cultivos de ácaros contienen la mayor cantidad de serinas proteasas y otros alérgenos mayores (45- 48); además, se ha informado que la actividad de la mayoría de las hidrolasas disminuye al entrar los cultivos en fase de muerte, a excepción de las serinas proteasas. Es por ello que el radio de actividad tripsina/quimiotripsina puede ser usado como parámetro para el control de la calidad de los extractos durante su obtención (49-50).

Nuestros resultados muestran una técnica eficiente en la producción de extractos somáticos de ácaros DF a partir de diferentes lotes de material liofilizado. Los extractos somáticos obtenidos tienen un perfil electroforético que permite afirmar su idoneidad proteica y evidenciar sus fracciones electroforéticas mayores. Los lotes preparados a partir de cultivos *in vitro* entre 72-96, mantenidos a las mismas condiciones de temperatura, humedad y régimen alimenticio, muestran que el tiempo de cultivo es una variable importante determinante de la calidad del extracto. Los diferentes extractos preparados mostraron tener actividad enzimática y una evidente capacidad de unión a IgE sérica proveniente de individuos alérgicos con diagnóstico de asma

bronquial y/o rinitis alérgica, especialmente los extractos A1, A2 y A3. Es así entonces como la producción de estos extractos evidencia la capacidad técnica y científica para producir y evaluar extractos somáticos alérgicos de ácaros intradomiciliarios, provenientes de cultivos puros de DF nativos a partir de exponentes de la acaro fauna del Caribe colombiano con el propósito de generar nuevos desarrollos tecnológicos con fines de aplicación en ciencias biomédicas.

Agradecimientos: Los autores agradecen al Grupo de Alergología Experimental de la Universidad de Cartagena por la asesoría en el establecimiento del cultivo de los ácaros.

Conflicto de intereses: Ninguno.

Financiación: Este estudio fue realizado en el marco del convenio de cooperación interinstitucional celebrado entre la Universidad del Norte y la Universidad del Magdalena, con apoyo del proyecto "Producción y purificación de anticuerpos IgY Policlonales Antipeptidos alérgicos del Grupo 1 de ácaros intradomiciliarios inducidos por Secuencias Peptídicas Sintéticas", financiado por Colciencias. Código 121534419081.

REFERENCIAS

- (1) Hong C, Park H, Heon Oh S. Dermatophagoides farinae, an important allergenic substance in Buckwheat- Husk Pillows. *Yonsei Medical Journal* 1987; 28 (4): 274-81. [PubMed] Free Article.
- (2) Moraes L, Barros M, Takano O, Assam N. Risk factors, clinical and laboratory aspects of asthma in children. *J Pediatr (Rio J)* 2001; 77 (6): 447-54. [PubMed].
- (3) Arshad SH. Indoor allergen exposure in the development of allergy and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2003; 3 (2): 115-20. [PubMed].
- (4) Squillace SP, Sporik RB, Rakes G, Couture N, Lawrence A, Merriam S et al. Sensitization

- to dust mites as a dominant risk factor for asthma among adolescents living in central Virginia. Multiple regression analysis of a population-based study. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156 (6): 1760-4. [PubMed] Free Article.
- (5) Caraballo L, Puerta L, Fernández-Caldas E, Lockey RF, Martínez B. Sensitization to mite allergens and acute asthma in a tropical environment. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1998; 8(5): 281-4. [PubMed].
- (6) Roche N, Chinet TC, Huchon GJ. Allergic and nonallergic interactions between house dust mite allergens and airway mucosa. *Eur Respir J*. 1997; 10: 719-26. [PubMed] Free Article.
- (7) Mercado D, Puerta L, Caraballo L. Niveles de alérgenos de ácaros en el polvo de habitación en Cartagena (Colombia). *Biomédica* 1986; 16: 307-14. [LILACS].
- (8) Caraballo L, Cadavid A, Mendoza J. Prevalence of asthma in a tropical city of Colombia. *Ann Allergy* 1992; 68(6):525-9. [PubMed].
- (9) Puerta L, Fernández - Caldas E, Jockey R, Caraballo L. Mite allergy in the tropics: sensitization to six domestic mites species in Cartagena (Colombia). *J. Invest Allergol Clin Immunol* 1993; 3: 198-204. [PubMed].
- (10) Meza J, Mendoza D, Mercado D. Identificación de ácaros del polvo casero en colchones y almohadas de niños alérgicos de Santa Marta (Colombia). *Duazary* 2008; 5(1): 23-30. Disponible en: http://imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=51956&id_seccion=2051&id_ejemplar=5260&id_revista=127
- (11) Fernández-Caldas E, Puerta L, Mercado D, Lockey RF, Caraballo L. Mite fauna, Der p1, Der f1 and *Blomia triopicalis* allergen levels in tropical environment. *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 292-7. [PubMed].
- (12) Barber D, Chamorro MJ, Carpizo. Cuantificación de la presión alérgica ambiental. Interés de esta determinación en la prevención, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 1990; 5: 125-32.
- (13) Musu T, Grégoire C, David B, Dandeu JP. The relationships between the biochemical properties of allergens and their immunogenicity. *Clin Rev Allergy Immunol* 1997; 15 (4): 485-98. [PubMed].
- (14) Chen CL, Lee CT, Liu YC, Wang JY, Lei HY, Yu CK. House dust mite *Dermatophagoides farinae* augments proinflammatory mediator production and accessory function of alveolar macrophages: implications for allergic sensitization and inflammation. *J Immunol* 2003; 170 (1): 528-36. [PubMed] Free Article.
- (15) Nakamura T, Hirasawa Y, Takai T, Mitsuishi K, Okuda M, Kato T et al. Reduction of skin barrier function by proteolytic activity of a recombinant house dust mite major allergen Der f 1. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2719-23. [PubMed] Free Article.
- (16) Stewart GA, Kollinger MR, King CM, Thompson PJ. A comparative study of the serine protease from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae*. *Allergy* 1994; 49: 553-560. [PubMed].
- (17) García Robaina JC. Nuevos alérgenos de ácaros. *Alergol Inmunol Clin* 2002; 17 (2): 65-70.
- (18) Batard T, Hrabina A, Bi XZ, Chabre H, Lemoine P, Couret MN et al. Production and proteomic characterization of pharmaceutical-grade *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* extracts for allergy vaccines. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 140(4): 295-305. [PubMed].
- (19) Becker WM, Vogel L, Vieths S. Standardization of allergen extracts for immunotherapy: where do we stand? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006; 6 (6): 470-5. [PubMed].
- (20) Grier TJ, Hazelhurst DM, Duncan EA, West TK, Esch RE. Major allergen measurements: sources of variability, validation, quality assurance, and utility for laboratories, manufacturers, and clinics. *Allergy Asthma Proc* 2002; 23 (2): 125-31. [PubMed].

- (21) van Ree R, Chapman MD, Ferreira F, Vieths S, Bryan D, Cromwell O et al. The CREATE project: development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification. *Allergy* 2008; 63 (3): 310-26. [PubMed] Free Article.
- (22) Grier TJ. Laboratory Methods for Allergen Extract Analysis and Quality Control. *Clin Rev Allerg Immunol* 2001; 21: 111-40. [PubMed].
- (23) Larsen JN, Dreborg S. Standardization of allergen extracts. *Methods Mol Med* 2008; 138: 133-45. [PubMed].
- (24) Brunetto B, Tinghino R, Braschi MC, Antonicelli L, Pini C, Iacovacci P. Characterization and comparison of commercially available mite extracts for in vivo diagnosis. *Allergy* 2010; 65 (2): 184-190. [PubMed].
- (25) Collof M, Spierman F. Pictorial keys for the identification of domestic mites. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 823-830. [PubMed].
- (26) Hart BJ, Crowther D, Wilkinson T, Biddulph P, Ucci M, Pretlove S et al. Reproduction and development of laboratory and wild house dust mites (Acari: Pyroglyphidae) and their relationship to the natural dust ecosystem. *Journal of Medical Entomology* 2007; 44 (4): 568 - 74. [PubMed].
- (27) Ree HI, Lee IY, Kim TE, Jeon SH, Hong CS. Mass culture of house dust mites, *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *Med Entomol Zool* 1997; 48: 109-16. Abstract.
- (28) Oribe Y, Miyazaki Y. Effects of Relative Humidity on the Population Growth of House-Dust Mites. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 2000; 19 (4): 201-3. [PubMed] Free Article.
- (29) Arlian LG, Neal JS, Bacon SW. Survival, fecundity, and development of *Dermatophagoides farinae* (Acari: Pyroglyphidae) at fluctuating relative humidity. *J Med Entomol* 1998; 35 (6): 962-6. [PubMed].
- (30) Yi FC, Chew FT, Jiménez S, Chua KY, Lee BW. Culture of *Blomia tropicalis* and IgE immunoblot characterization of its allergenicity. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1999; 17 (3): 189-94. [PubMed].
- (31) Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 1972; 72: 248 -54. [PubMed] Free Abstract.
- (32) Fernández-Caldas E, Iraola V, Carnés J. Molecular and biochemical properties of storage mites (except *Blomia* species). *Protein Pept Lett* 2007; 14 (10): 954-9. [PubMed].
- (33) Nisbet A, Billingsley P. A comparative survey of the hydrolytic enzymes of ectoparasitic and free-living mites. *International Journal of Parasitology* 2000; 30: 19-27. [PubMed].
- (34) Dinsdale D. The digestive activity of a phthiracarid mite mesenteron. *J Insect Physiol* 1974; 20: 2247- 60. [PubMed].
- (35) Fernández-Caldas E, Gallego M, Carnés J, Iraola V. Enzymatic activity of *Dermatophagoides pteronyssinus* extracts after acidic treatment. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 145 (4): 298-304. [PubMed].
- (36) Jeong KY, Kim C, Yong TS. Enzymatic activities of allergen extracts from three species of dust mites and cockroaches commonly found in korean home. *Korean J Parasitol* 2010; 48 (2): 151-5. [PubMed] Free Article.
- (37) Cui Y, Zhou P, Peng J, Peng M, Zhou Y, Lin Y et al. Cloning, sequence analysis, and expression of cDNA coding for the major house dust mite allergen, Der f1, in *Escherichia coli*. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41 (5): 380-8. [PubMed] Free Article.
- (38) Cui YB, Cai HX, Li L, Zhou Y, Gao CX, Shi WH, Yu M. Cloning, sequence analysis and expression in *E. coli* of the group 3 allergen of *Dermatophagoides farinae*. *Chin Med J* 2009; 122 (21): 2657-61. [PubMed] Free Article.
- (39) Kato T, Takai T, Fujimura T, Matsuoka H, Ogawa T, Murayama K et al. Mite serine protease activates protease-activated receptor-2 and induces cytokine release in human keratinocytes. *Allergy* 2009; 64 (9): 1366-74. [PubMed].
- (40) Lake FR, Ward LD, Simpson RJ, Thompson PJ, Stewart GA. House dust mite-derived

- amylase: allergenicity and physicochemical characterization. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87 (6): 1035-42. [PubMed].
- (41) Kawamoto S, Mizuguchi Y, Morimoto K, Aki T, Shigeta S, Yasueda H et al. Cloning and expression of Der f6, a serine protease allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1454 (2): 201-7. [PubMed].
- (42) O'Neil SE, Heinrich TK, Hales BJ, Hazell LA, Holt DC, Fischer K et al. The chitinase allergens Der p15 and Der p18 from *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* 2006; 36 (6): 831-9. [PubMed].
- (43) Stewart GA, Laker FR, Thompson PJ. Faecally derived hydrolytic enzymes from *Dermatophagoides pteronyssinus*: physicochemical characterization of potential allergens. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991; 95: 248-56. [PubMed].
- (44) Ando T, Homma R, Ino Y, Ito G, Miyahara A, Yanagihara T et al. Trypsin like protease of mites: purification and characterization of trypsin like protease from mite faecal extract *Dermatophagoides farinae*. Relations hip between trypsin like protease and Der f III. *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 777-84. [PubMed].
- (45) Martínez J, Eraso E, Palacios R, Guisantes JA. Enzymatic analyses of house dust mite extracts from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* (acari: pyroglyphidae) during different phases of culture growth. *Journal of Medical Entomology* 1999; 36 (3): 370-S. [PubMed].
- (46) Martínez J, Eraso E, Palacios R, Guisantes JA. Cross-reactions between *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* (Acari: Pyroglyphidae) related to the different growth phases of cultures. *J Med Entomol* 2000; 37(1):35-9. [PubMed].
- (47) Brunetto B, Tinghino R, Braschi MC, Antonicelli L, Pini C, Lacovacci P. Characterization and comparison of commercially available mite extracts for in vivo diagnosis. *Allergy* 2010; 65(2):184-90. [PubMed].
- (48) Eraso E, Martínez J, Martínez A, Palacios R, Guisantes JA. Quality parameters for the production of mite extracts. *Allergol Immunopathol* 1997; 25 (3): 113-7. [PubMed].
- (49) Eraso E, Martínez J, García-Ortega P, Martínez A, Palacios R, Cisterna R et al. Influence of mite growth culture phases on the biological standardization of allergenic extracts. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1998; 8 (4): 201-6. [PubMed].
- (50) Eraso E, Guisantes JA, Martínez J, Sáenz de Santamaría M, Martínez A, Palacios R et al. Kinetics of allergen expression in cultures of house dust mites, *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae* (Acari: Pyroglyphidae). *J Med Entomol* 1997; 34(6): 684-9. [PubMed].