

32
20 jr.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



**EXTRACCION E IDENTIFICACION DE PROTEINAS, DE EXTRACTOS
DE ACARO DE POLVO CASERO (Dermatophagoides pteronyssinus)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A

MARCO ANTONIO MARTINEZ CORDERO

ASESOR: M. EN C. VICTOR MANUEL ZENDEJAS BUITRON

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Extracción e identificación de proteínas, de extractos
de ácaro de polvo casero (Dermatophagoides pteronyssinus)".

que presenta el pasante: Marco Antonio Martínez Cordero
con número de cuenta: 8657081-9 para obtener el TITULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 18 de Febrero de 1994

| | | |
|------------------|--|----------|
| PRESIDENTE | <u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u> | |
| VOCAL | <u>Dr. Marco Antonio Vega López</u> | |
| SECRETARIO | <u>M. en C. Víctor Manuel Zendejas Buitrón</u> | |
| PRIMER SUPLENTE | <u>Q.B.P. Antonio Sánchez Ortega</u> | 23-II-94 |
| SEGUNDO SUPLENTE | <u>Q.F.B. Pené Damian Santos</u> | |

DEDICATORIAS:

A mi mamá
Esperanza Cordero Lopez

A mis hermanos
Julio, Ricardo, Graciela, Miguel, Reyna y María

por su paciencia y porvenir

Con admiración y respeto a los hombres que guían e inducen a la continua búsqueda de la decisión, la realización, la actividad y una afirmación personal, para sentirse satisfechos en cada etapa y actividad en la vida.

AGRADECIMIENTOS:

A la F.E.S.- C. U.N.A.M. por la preparacion y formacion
académica ofrecida.

Al profesor Victor por su disposicion y asesoramientos en
la elaboracion de la tesis.

Al Departamento de Inmunologia de la E.N.C.B.-I.P.N.
por sus comentarios y apoyo material.

Al personal del Lab. Clinico del H. R. Adolfo L. Mateos.

Al personal del Banco de México Fabrica de Billetes
por su ayuda oportuna y su atencion.

Lugar donde se realizo:

Departamento de Inmunologia

de la Escuela Nacional de Ciencias Biologicas
del Instituto Politecnico Nacional.

Indice general

| | |
|---|-------|
| Abreviaturas | (1) |
| 1.0 Resumen | (2) |
| 2.0 Introduccion. | (3) |
| 2.01 Antecedentes de alergias y polvo casero | (4) |
| 2.02 Barreras de proteccion contra alergenos | (5) |
| 2.03 Factores que predisponen a desencadenar alergias | (6) |
| 2.04 Tipos de alergenos | (6) |
| 2.05 Polvo casero como alergeno | (7) |
| 2.06 Caracteristicas del acaro y sus alergenos | (8) |
| 2.07 Respuesta inmune en las alergias | (10) |
| 2.08 Caracteristicas, de extractos de polvo casero | (12) |
| 2.09 Metodos de extraccion de polvo casero | (13) |
| 2.10 Estudios de los extractos alergenicos | (14) |
| 3.0 Justificacion del problema | (16) |
| 4.0 Objetivos | (17) |
| 5.0 Material, reactivos y metodologias | (18) |
| 6.0 Resultados | (29) |
| 7.0 Discusion | (36) |
| 8.0 Conclusiones | (40) |
| 9.0 Apéndice | (41) |
| 10.0 Glosario | (46) |
| 11.0 Bibliografía | (47) |

Indice de figuras

Fig. 1 Diseño experimental de las extracciones A, B y C, del polvo casero, evaluando las condiciones por la determinación de proteínas, carbohidratos y SDS-PAGE (20)

Fig. 2 Diagrama de flujo de las extracciones A, para determinar la utilidad de los inhibidores de proteasas, en la extracción de Der. pI y Der. pII, evaluandose por contenido de proteínas, carbohidratos y SDS-PAGE (22)

Fig. 3 Diagrama de flujo en las extracciones B, evaluando tiempo y temperatura para la extracción de Der pI, por determinación de proteínas, carbohidratos y por SDS-PAGE. (24)

Fig. 4 Diagrama de flujo de la extracción de polvo casero C₁ y de nutrientes E_m, para compararlas con extracto comercial y purificado en SDS-PAGE (26)

Fig. 5 Diagrama de flujo para establecer condiciones favorables en SDS-PAGE, al separar e identificar las proteínas de los extractos de polvo casero (28)

Fig. 6 Identificación de proteínas de las extracciones B, por SDS-PAGE (12 %), tinción con azul de Coomassie, empleando reguladora de muestra 2x y 8x (31)

Fig. 7 Proteínas del extracto B reconcentrado (B₁⁻) en SDS-PAGE (12.1 %), empleando reguladora de muestra 8x, teñidos con azul de Coomassie (32)

Fig. 8 Comparación de proteínas del extracto C₁, con extracto de nutrientes, comercial y purificado de polvo casero en SDS-PAGE, teñidos con azul de Coomassie (33)

Indice de tablas

Tabla 1 Comparación del número de proteínas en los extractos de Der p1, por SDS-PAGE, empleando reguladora de muestra 2x y 8x, teñidos con azul de Coomassie (29)

Tabla 2 Contenido de proteínas y carbohidratos en los extractos B, C, y comerciales de polvo casero (30)

Tabla 3 Comparación de proteínas del extracto C₁ por P.M. con diferentes extractos de polvo casero en SDS-PAGE, teñidos con azul de Coomassie (34)

Abreviaturas

- A₁ Extracción A del polvo casero con el uso de inhibidores de proteasas, para Der pI.
- A₂ Extracción A del polvo casero sin inhibidores.
- Aa Extracción A del flotante de polvo casero, con el uso de inhibidores de proteasas, para Der pII.
- A_b Extracción A del flotante del polvo casero sin inhibidores.
- B₁ Extracción B, del polvo casero a temperatura ambiente por 2 horas, para Der pI.
- B₁r Extracción B₁ reconcentrada.
- B₂ Extracción B, del polvo casero en refrigeración durante 24 horas, para Der pI.
- B_a Reextracción de la pastilla de B₁.
- B_b Reextracción de la pastilla de B₂.
- C₁ Extracción del polvo casero a 4 horas, para Der pI.
- D.p. *Dermatophagoides pteronyssinus*.
- Der pI Alergeno principal de *Dermatophagoides pteronyssinus*
- Der pII Alergeno secundario de *Dermatophagoides pteronyssinus*
- Dp^c Extracto comercial de *Dermatophagoides pteronyssinus*.
- Dp^p Extracto de acaro purificado y recombinante.
- E_m Extracto de levaduras, uñas, escamas y pelo.
- M.P. Marcadores de Peso Molecular.
- SDS-PAGE Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

1.0 Resumen

Con la determinación de proteínas y elaboración de SDS-PAGE, las mejores condiciones de la extracción de los posibles alérgenos del acaro de polvo casero *Dermatophagoides pteronyssinus*, solubilizadas en medio acuoso fueron: refrigeración, emplear una solución amortiguadora de boratos a pH= 8.5, uso de inhibidores de proteasas, agitación mecánica y tiempo de extracción de 4 horas; en reextracciones de polvo aun se obtienen proteínas. Las condiciones en SDS-PAGE mas favorables fueron: una concentración y diálisis de los extractos, volumen de 45 μ l de muestra y 5 μ l reguladora de muestra 8x, electroforesis en refrigeración a 20 mA, gel discontinuo a 12.0 % de monómeros. El numero de proteínas fue: en el extracto comercial (Dp=) 18, con rango de 7.5 a 114.8 kDa; extracto de levaduras, uñas, escamas y pelo (E_m) 21, de 7.5 a 114.3 kDa; extracto de polvo casero purificado y recombinante (Dp=) 6, con intervalo de 7.5 a 72.4 kDa y para el extracto que obtuvimos (C₁) 20 proteínas de 7.5 a 114.8 kDa. En los cuatro extractos hay proteínas cercanas en peso molecular a los alérgenos reportados. Algunas consideraciones en posteriores estudios son: aumento del numero de inhibidores de proteasas, uso de tubo de diálisis con poro de exclusion de 1 kDa, determinar proteínas por metodo de Bradford y tincion de geles con nitrato de plata.

2.0 Introducción

Los alérgenos del acaro de polvo casero *D. pteronyssinus* y de diversos polenes, venenos y medicamentos para causar alergias, tienen que pasar por los mecanismos de defensa inespecíficos y específicos, después combinados con otros factores desencadenarán el proceso alérgico, que está mediado por la inmunoglobulina IgE, esta se fija a los receptores Fc de las células cebadas y basófilos, en posteriores ingresos del alérgeno, será reconocido por la IgE-célula cebada, produciéndose la liberación de aminas vasoactivas productoras de la vasodilatación y las patologías alérgicas como: rinitis, asma o dermatitis atópica, debidas a los alérgenos del acaro.

En la elaboración de extractos de polvo casero, se han empleado condiciones muy variadas con respecto al pH, empleo de inhibidores, tiempo de extracción, temperatura y agitación; el origen y la extracción del polvo casero, suele ser muy variado siendo polvo completo o cultivos de acaros puros. Después de obtener los productos solubles, en el disolvente, se puede determinar la cantidad de proteínas y carbohidratos; pueden ser separados e identificado cada compuesto en número, peso molecular con técnicas como electroforesis en geles de poliacrilamida, Sephadex o hacer precipitaciones con agentes como acetona. soluciones saturadas de sulfato de amonio o de ácido tricloroacético en diferentes concentraciones. La actividad biológica del alérgeno y su localización, se puede realizar con pruebas

inmunológicas, donde los anticuerpos contra las fracciones antigénicas se fijan e identifican con técnicas como ELISA, RAST o IET.

2.01.- Antecedentes de alergia y polvo casero.

En 1902 Richet y Portier, inmunizando perros observaron que al inyectarles por segunda vez un antígeno morían en pocos minutos, fenómeno que denominaron anafilaxia ³⁷.

Von Pirquet acuñó el término de alergia, en 1906, observando que al administrar por segunda vez un antígeno producía extraños trastornos ^{14,31}.

Las pruebas cutáneas con extractos de alérgenos fueron usadas por Cooke en 1911 ³⁷.

En 1915 algunos métodos para la preparación de extractos alérgicos fueron descritos por Coca ³⁸.

A la presencia de algunas sustancias en el suero, responsables de la reacción de hipersensibilidad se les denominó reaginas en 1921 por Prausnitz y Kustner ^{20,33,41}. Ese mismo año, con un extracto de polvo doméstico, aplicado en asmáticos, se detectaron reacciones positivas en los estudios de Kern ^{43,44}.

En 1923 Coke apoyó lo anterior al aplicar el extracto en sus pacientes, atribuyendo la reacción a hongos y a células de descamación del hombre y de animales ⁴⁵. Van Lewen postuló la posible existencia de ácaros; Ancona descubrió unos cuadros alérgicos por inhalación de ácaros ^{19,44,47}.

Son conclusiones de Adelsberger en 1929 que el principio activo del polvo casero es termolábil, se disuelve en agua y solución amortiguada ⁴³.

En 1942 Boather y Sutherland trataron de identificar los componentes específicos del polvo casero, por precipitaciones fraccionadas con disolventes orgánicos y sulfato de amonio ⁴³.

Voorhorst, Spieksma-Boezeman en 1964 demostró que los *Dermatophagoides spp* son los productores de alérgenos ^{22,42}.

En 1966, Ishizaka y Johansson identifican que los anticuerpos responsables de la sensibilidad cutánea pertenecen a una clase de inmunoglobulinas reconocidas como IgE ^{31,37}.

2.02.- Barreras de protección contra alérgenos

La función de las barreras de protección es mantener la integridad funcional y estructural de los órganos; para abordar el organismo, los alérgenos encuentran impedimentos como: la barrera mucocutánea, las enzimas, vellosidades, cilios y pH. Después el sistema inmune detecta, vigila y reconoce los antígenos exógenos, dándose el procesamiento de fracciones antigénicas, para que se desencadenen los mecanismos de defensa celular y humoral ^{15,24,33}.

Las reacciones de hipersensibilidad se clasifican en cuatro, al *D. pteronyssinus* se le implica en la I, III y IV. La primera reacción es la más común y predominante en la clínica ^{41,47}, también es denominada como de tipo inmediato. Esta reacción está mediada por reagentes, se produce en

segundos o hasta 20 minutos, después de un segundo contacto con los alérgenos, se presenta en personas atópicas, cuando se producen IgE, en un primer contacto al alérgeno. Las IgE se adhieren a células cebadas y basófilos mediante la fracción cristalizante (Fc). En posteriores desafíos el alérgeno al unirse a las IgE fijadas a células sensibilizadas, provocará la liberación de aminas vasoactivas que darán lugar al grupo de patologías alérgicas 1.4.

2.03.- Factores que predisponen a desencadenar alergias

La situación y la respuesta alérgica está controlada por: la vía de exposición repetida e intensa, dosis de alérgenos, predisposición genética ²¹⁻²², naturaleza química del alérgeno, factores como: temperatura, humedad, aumento de contaminantes, irritantes industriales, nuevos productos químicos, medicamentos, estrés, desnutrición, así como infecciones virales y bacterianas intermitentes del aparato respiratorio y de la piel ²³.

2.04.- Tipos de alérgenos

Los alérgenos que suelen ser inocuos, pueden provocar alergia en individuos atópicos expuestos a ellos. Según la vía de acceso al organismo se clasifican en: neumoalérgenos, trofoalérgenos y dermoalérgenos ²⁴. Se han aislado y caracterizado diferentes fuentes como: polenes, caspa de animales, polvo casero, venenos de insectos, fármacos y

alimentos; suelen ser proteínas y glicoproteínas, su peso molecular varia de 2.8 a 65 kDa ^{7,31}.

Dentro de los alérgenos que pueden ser inhalables los más frecuentes son polvo doméstico y ácaros de polvo casero, seguido de esporas de hongos, pólenes de árboles, plantas y epitelios de animales y en menor grado residuos de insectos, saliva, lana, plumas, caspa, pelo de animales, productos químicos industriales y restos de alimentos, los cuales pueden ser transportados por el viento ^{19,33,43}. Algunos alérgenos inhalados de polvo, pólenes e insectos suelen ser multialérgenos lo que indica que cada fuente posee alérgenos mayores y menores; un 90% de atópicos son altamente reactivos a los mayores y de 10 a 15 % a los alérgenos menores. Los alérgenos mayores conocidos son proteínas de peso molecular de 20 a 40 kDa, los alérgenos menores pueden ser proteínas o polipéptidos con un peso molecular tan grande como 65kDa o tan pequeños como 2.8 kDa ^{19,31,43}

2.05.-Polvo casero como alérgeno

El polvo casero es una mezcla heterogénea de elementos en degradación que incluye productos epidérmicos del hombre y de animales, esporas y micelios de hongos, material fibroso pólenes, restos de alimentos vegetales y cucarachas ^{27,37,42}. Cuando las personas presentan pruebas cutáneas positivas a extractos de polvo casero, se plantea la interrogante de cual

de todos sus numerosos componentes es el alergeno principal o unico del polvo 7.31.

Se ha reconocido y demostrado que el principal alergeno se relaciona con la presencia mas comun en las muestras de *Dermatophagoides spp* 22.23.40. Las evidencias en diversas partes del mundo son: su abundancia en alcobas, producir un pico anual en la sintomatologia de pacientes susceptibles, de agosto a noviembre, un incremento en la poblacion de insectos que después declina gradualmente y por la sensibilidad de pacientes a soluciones muy diluidas de los preparados en los laboratorios 4.39.40.

2.06.- Característica del acaro y sus alergenos

Algunas características del *D. pteronyssinus* son: mide de 175 a 350 μm de longitud, su forma es ovalada, cutícula estriada, no son segmentados, tienen cuatro pares de patas articuladas sus excretas miden de 10 a 40 μm 8.30.42.49. Suelen encontrarse en diferentes sitios de la casa como: el suelo de dormitorios, en alfombras, muebles tapizados, pliegues de colchones y ropa de cama entre otros. Algunos factores propicios para su reproducción y desarrollo suelen ser predominio de humedad relativa (75%), temperatura (23°C), lugares poco ventilados, ausencia de luz, desaseo del inmueble, continuos desechos de epitelios, alimentos, mohos e insectos. Los colchones suelen ser los lugares predilectos de anidación del *D. pteronyssinus* ya que se nutre esencialmente de las escamas dérmicas humanas 4.39.40.22. Se han propuesto

diferentes caminos por los que los acaros secretan y excretan sus productos alergénicos, estos se encuentran en sus escamas, su materia fecal, sus huevecillos y glándulas laterales secretoras. Se estima que los acaros producen, en condiciones óptimas, 20 heces por día, se producen en forma de bolitas recubiertas de proteínas, que por su tamaño pueden atravesar la barrera nasofaríngea y provocar en primera instancia, rinitis y posteriormente asma. Las heces contienen 95 % del alergeno principal, Der pI, que puede ser sintetizado y excretado en el canal alimentario 23.32.40. De los alérgenos menores se encuentran, Der pII, presente principalmente en la cutícula del acaro, podría ser originado por los productos propios de la descamación del acaro o bien por las glándulas de secreción, no puede alcanzar la barrera nasofaríngea y al tener solo contacto con la piel humana produce principalmente dermatitis 18.34.40.47. Otros alérgenos menores, Der pIII y Der pIV, están en cantidades menores y se encuentran, tanto en la cutícula como en las heces 20.44. Algunos alérgenos en los acaros pueden presentar reacciones cruzadas entre los diferentes géneros y especies debido a los determinantes antigénicos, que son muy similares 17.32.33.

El Der pI tiene puntos isoeléctricos (pI) de 4.7 a 7.4, tres cuartas partes de las IgE están dirigidas contra él, es una glicoproteína, termosensible, hidrosoluble, estable hasta los 37°C, con 222 residuos de aminoácidos, peso molecular de 24-26 kDa, se le asocia con una cisteína, 50 % de su

antigenicidad se pierde a 56°C por una hora, se desnaturaliza a 80°C y a pH= 2 y 12 ^{11,18,20}.

Der pII tiene de 129-49 residuos de aminoácidos. con P.M. de 14-15 kDa, es una proteína hidrosoluble, estable a pH= 2 y 12, tolera los 100°C por 10 minutos, su p.I. es de 5-8.3; a Der pIII se le identifica como una tripsina. p.I. de 3-7, P.M. de 29-31 kDa y el Der pIV es una posible amilasa con P.M. de 60 kDa ^{10,17,21,40,48}.

2.07.- Respuesta inmune en las alergias.

Los anticuerpos que se pueden encontrar contra alérgenos específicos son IgA, IgG e IgE; esta última es la predominante en atópicos ⁴. Se ha sugerido que la IgE está involucrada cuando surgen procesos parasitarios infecciosos, alérgicos y en algunos mielomas ^{1,31,37,41}.

El proceso de las alergias, por alérgenos, resulta de la siguiente manera: en el individuo, al ser susceptible, el alérgeno pasa las mucosas y barreras inespecíficas hasta llegar a la submucosa.

Las primeras células en acudir contra el alérgeno soluble son los macrófagos, los cuales lo fagocitan, presentando la fracción antigénica junto con el Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase II, al linfocito T (LT), que en sus diversas variedades, de manera específica se encargan de reconocer al antígeno, siendo los LT cooperadores (LTh) tipo II activado por interleucina 4 (IL-4) o el LTh tipo I activado por interferón gama (INF- γ). para modular la

producción de IgE de manera positiva y negativa respectivamente, también se postula que los LTh e Interleucinas ejercen una acción específica de estimular o suprimir la diferenciación de linfocitos B (LB) a células plasmáticas.

En atópicos, la producción de IgE se da en grandes cantidades, esta síntesis es local, sensibiliza primero a las células cebadas locales al unirse a los receptores de membrana con especificidad para Fc de las IgE, esta inmunoglobulina pasa a circulación sanguínea donde perdurara por dos y medio días, uniéndose a los receptores Fc de basófilos circulantes, después se une a las células cebadas que se encuentran en todo el cuerpo perdurando por seis meses 13,38,39,47. Por reexposiciones al alergeno, se da su interacción con la IgE específica haciendo un puente entre dos IgE, para que en el interior de la membrana se estimule el desencadenamiento de reacciones como son el adenosin monofosfato cíclico que junto con el receptor de calcio (que ocasiona la apertura de los canales), provoca en la superficie de la membrana de la célula cebada la exocitosis del contenido de los gránulos, con la liberación de los mediadores preformados como la histamina, heparina, serotonina, factor quimiotáctico para eosinófilos (FQE) y para neutrófilos (FQN) y después se da la inducción de la síntesis de mediadores formados *de novo* a partir del ácido araquidónico: las prostaglandinas (PG), leucotrienos (LTC) y factor activador de plaquetas (PAF) 13,38,42,47,51.

2.08.- Características de extractos de polvo casero.

Los extractos no significan una replica total al 100% de lo que son las muestras alergénicas en su estado natural. Muchas de sus proteínas naturales son parcialmente destruidas después de su solubilización y limitado número se combina con las IgE ¹². Cientos de extractos alergénicos son producidos por diversos fabricantes, utilizados para comercializarlos y emplean diferentes procedimientos para producirlos. El origen de sus materiales es también muy variado y son marcados idénticamente; por lo que no hay un método y extracto aceptado como el más satisfactorio. La mayoría de estos extractos son utilizados para pruebas cutáneas diagnósticas, siendo de composición química indefinida, de preparación empírica y carentes de pruebas de evaluación biológica ^{9,12,20,23}. La mayoría de los extractos alergénicos son mezclas complejas, contienen además de los residuos de los ácaros, escamas epiteliales, hongos, insectos, alimentos o bacterias, en donde los alérgenos activos constituyen una minoría de la mezcla total. Dentro de los diferentes compuestos moleculares no alergénicos hay proteínas, carbohidratos, lípidos, enzimas, pigmentos, en ciertos casos micotoxinas, endotoxinas, sustancias irritantes y otros elementos que pueden ocasionar falsos positivos ^{4,9,21,24,26,33,43}. En los extractos del polvo casero se han determinado aproximadamente 51 proteínas, a 11 de ellas, se les ha encontrado unión con la IgE ^{11,12,37}.

2.09.- Métodos de extracción de polvo casero

La mayoría de los extractos de los alérgenos se preparan utilizando soluciones amortiguadas. Se pueden presentar como soluciones acuosas, glicerinadas al 50% o bien liofilizadas; los extractos liofilizados y glicerinados son más estables durante su almacenamiento que los acuosos 21.31.44.

Algunos pasos y condiciones llevadas a cabo, en los métodos de extracción del polvo casero son: los grumos presentes en las muestras del polvo casero disgregarlos con un mortero para reducir su tamaño 3.10.30, posteriormente tamizar en mallas 30, después desengrasar con acetona, éter, formaldehído o tolueno 3.6.21.30, evaporar los disolventes, desecar la muestra, para pesar y solubilizar en solución amortiguada de fosfatos, boratos, carbonatos o tris-HCl, en relación 1:20 ó 1:10 (peso/volumen), las soluciones amortiguadas tienen un rango de pH de 7.5-9.2 7.7.24.27.40; también contienen antibacterianos como la azida ó fenol e inhibidores de proteasas como el fenilmetilsulfanil fluoruro (PMSF), N-tosililclorometil cetona (TLCK), N-tosilfenilalaninaclorometil cetona (TPCK), benzamida, aprotina y leupeptil, entre otros. La solubilización se realiza a temperatura ambiente ó a 4°C, con agitación que va de 20 minutos a 48 horas 7.10.21.27.27.32, centrifugar de 2000 a 16000 g por un periodo de 15 a 30 minutos 10.21.27.40, después filtrar para eliminar partículas grandes y coloridas, así como esterilizar con papel microbiológico 3.11.42. El extracto se puede concentrar por refrigeración ó

lío-filización. El concentrado se disuelve y dializa para eliminar el exceso de sales e irritantes del extracto ⁴³. La evaluación del contenido de proteínas se puede realizar con métodos colorimétricos como son Lowry, Bradford o con ninhidrina ^{17,21,30,40}.

La identificación del *D. pteronyssinus* en el polvo casero, proveniente de una muestra o cultivo, se puede realizar por observación directa al microscopio o bien separarlo por flotación. La flotación puede realizarse con una solución saturada de NaCl o CuSO₄ ^{30,30}. Separando al *D. pteronyssinus* se pueden elaborar un extracto y determinar el predominio de alérgenos secundarios. Después de la centrifugación, las diferentes proteínas, del extracto se puede precipitar con acetona o solución saturada de sulfato de amonio, en concentraciones crecientes ^{4,7,8,10,14,17,37,32}.

2.10.- Estudio de los extractos alérgenos

Algunos inconvenientes de los extractos, suelen contener sustancias farmacológicamente activas, que inducen la liberación de los mediadores de forma inespecífica, alterando la cinética de las enzimas responsables del equilibrio biológico del tejido y las que aumentan la sensibilidad de los receptores. La valoración de los alérgenos también se dificulta, por el constante proceso de degradación y pérdida de actividad que depende de factores como temperatura, pH, actividad enzimática propia de los alérgenos, solubilidad, conservación y tiempo de estabilidad del alérgeno ³³.

Una vez hecho el extracto alergénico se evalúa el contenido de proteínas y se separan e identifican con métodos como la precipitación fraccionada, cromatografía en columna o SDS-PAGE, indicando su contenido, pesos moleculares, cuantas son aisladas y que rangos de pesos moleculares tienen. La separación de las proteínas se hace con base a propiedades que tienen (carga eléctrica, tamaño molecular), al someterse con agentes electrostáticos (SDS) y en medios con poros fijos pueden ser retenidos o continuar en el disolvente hasta que se detenga su corrimiento, en el medio de soporte 42,47.

Para evaluar su actividad biológica se emplean técnicas *in vivo* e *in vitro*. En las primeras, al inocular en pacientes sensibles, el extracto estéril provoca la aparición de edema y eritema 39,42. En las segundas se emplean métodos como: inhibición por RAST, ELISA, Inmunofluorescencia y/o IET, donde se mide la especificidad alergénica, en el extracto 2,42. Algunas pruebas incluyen medir la potencia del alergeno, el cual puede constituir solo una pequeña parte de las proteínas totales del extracto 30.

En un extracto alergénico debe considerarse su estabilidad, pureza y poder antigénico para ser usado en los pacientes. El separar e identificar los antígenos de cada muestra alergizante, suele ser un trabajo lento y laborioso 4,8,9,17,48,49.

3.0 Justificación del problema

Los extractos del *D. pteronyssinus* y del polvo casero suelen tener una composición variable, debido al origen de la muestra y al proceso de su elaboración, que no son únicos; son de composición biomolecular indefinida y se emplean de una manera empírica en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes alérgicos. Las condiciones de extracción como: empleo de inhibidores de proteasas, temperatura (refrigeración y ambiente) y tiempo de agitación pueden ser evaluadas por el contenido de proteínas y carbohidratos; y al comparar cada factor establecerse, las condiciones más convenientes para elaborar el extracto; en SDS-PAGE se pueden separar, de cada extracto, las proteínas e identificar su número, peso molecular intervalos y comparar con otros extractos (comercial, purificado y de nutrientes). las proteínas que comparten y la posible presencia de los alérgenos (debido al peso molecular). Estos extractos permitirán hacer estudios inmunoquímicos, para detectar la presencia de anticuerpos contra los posibles alérgenos del polvo casero y tener consideraciones para las pruebas dérmicas, en personas que acuden al los Servicio Médicos.

4.0 Objetivos

1.- Establecer el uso de inhibidores de proteasas, como un agente para la extracción de proteínas del polvo casero.

2.- Indicar por comparación, los factores mas pertinentes de temperatura y tiempo, en la obtención de proteínas del polvo casero.

3.- Determinar condiciones favorables en SDS-PAGE para separar, identificar y comparar las proteínas de extractos de polvo casero.

5.0 Material, reactivos y metodologías.

- Mallas con diámetro de 0.25, 0.5 y 0.75 mm
- Micropotter.
- Micropipetas. Gilson, Oxford y Hamilton.
- Papel filtro Whatman N°1.

Equipo

- Balanza granataria.
- Microscopio estereoscópico.
- Agitador magnético.
- Potenciómetro.
- Espectrofotómetros Bauch and Lomb y Beekman D.U. 650.
- Refrigerador/congelador.
- Cámara de geles de poliacrilamida (Bio Rad MiniProtein Cell. Modelo 422).
- Fuente de poder (Bio Rad Modelo 200/2.0).

Reactivos

- Eter (de Beker).
- Inhibidores de proteasas:
 - fenilmetilsulfanil fluoruro (PMSF)*
 - N-etil maleimida (NEM)*
 - p-hidroxi-mercuri-benzoico (PHMB)*
- Azida de sodio.*
- Acrilamida.*
- N,N'-bis-acrilamida.*
- Trizma base.*
- Dodecil sulfato de sodio.*
- Persulfato de amonio.*

- N,N,N,N-tetrametilendiamina.*
- Glicina.*
- Azul de bromofenol.*
- Marcadores comerciales de peso molecular*
- Azul de Coomassie R-250.*

* Reactivos de Sigma Chemycal Company St Louis Mo.

Reactivos biológicos

- Muestra de polvo casero: Obtención: polvo casero recolectado de colchones, en la casa de pacientes que acuden al Servicio de Alergia en el Hospital Juárez de México. con aspiración por media hora, colocado en bolsas de plástico y trasladado al Laboratorio. Identificación: del acaro *D. pteronyssinus* en el microscopio estereoscópico. Cultivo: el polvo se mezcló 1:1 con nutrientes (escamas dérmicas, uñas y cabellos humanos y levaduras), se llevó a cajas petri, que tiene un soporte de yeso bloqueado con carbón activado, las condiciones de crecimiento fue a temperatura de 24 °C, 76 % de humedad relativa, durante 8 meses.**

- Levadura de cerveza (Tabletas de Mead Johnson).

- Uñas y cabello humano, de Servicios Estéticos.

- Escamas dérmicas humanas, obtenidas de sujetos no atópicos, por descamación normal y quemaduras de sol.

- Extracto de acaro purificado y recombinante, donado por DNAX, Palo Alto. California.

- Extracto comercial de *D. pteronyssinus* (de Laboratorios Freeman).

Metodologías

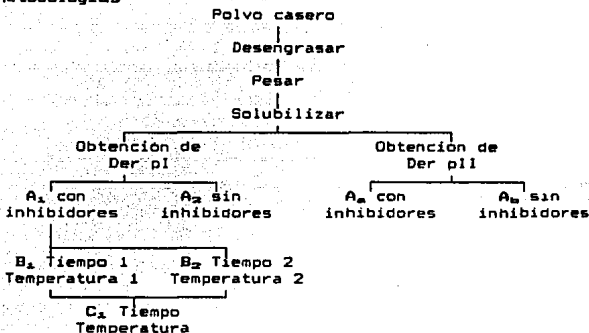


Fig. 1 Diseño experimental de las extracciones A, B y C de polvo casero, evaluando las condiciones por determinación de proteínas, carbohidratos y SDS-PAGE. A₁= extracto de polvo casero con inhibidores, para Der pI. A₂= extracto sin inhibidores. A_a= extracto con inhibidores, para Der pII. A_b= extracto sin inhibidores. B₁= extracto de polvo casero, con inhibidores a 2 horas, 24 °C, para Der pI. B₂= extracto a 24 horas en refrigeración. C₁= extracto final a 4 horas, en refrigeración, con inhibidores.

Las extracciones son denominadas A, B y C; dentro de estas extracciones se subdividen para comparar cada condición uso de inhibidores, agitación, temperatura y tiempo de extracción, indicadas con la letra y un subíndice (A₁, A₂, A_a, A_b, B₁, B₂, B_a, B_b y C₁)

Metodología del empleo de los inhibidores de proteasas en las extracciones A de polvo casero para Der pI y Der pII:

Las muestras de polvo casero se tamizan, en mallas de diámetro de 0.25, 0.5 y 0.75 mm. El polvo más fino se depositó en papel filtro sobre un embudo, se desengrasó con éter, dejándolo secar al aire y posteriormente se desecó, para deshidratar el polvo.

Obtención de Der pI:

Pesar 2 fracciones de 1.465 g del polvo, una solubilizarla en 14.65 ml de amortiguadora de fosfatos pH= 8.6, azida 0.1 %, inhibidores de proteasas (50 µg/ml) con agitación mecánica llamada (A₁) y la otra fracción con agitación manual, sin inhibidores de proteasas en 14.65 ml por 3 horas llamada (A₂).

Obtención de Der pII:

Pesar 2.93 g de polvo, depositado en 15 ml de NaCl saturado, agitar ligeramente, del flotante observar en el microscopio al *D. pteronyssinus*; el resto dividir en dos partes, macerar por separado en micropotter e ir solubilizando en amortiguadora de fosfatos pH= 7.6, con inhibidores (A_a) y la otra sin inhibidores (A_b) por 3 horas.

Dializar las muestras (A₁, A₂, A_a, A_b), primero en agua por 12 horas, después en amortiguadora 3 veces cada 3 horas.

Hacer la determinación de proteínas, carbohidratos y elaborar los geles de poliacrilamida, como se indica en el apéndice.

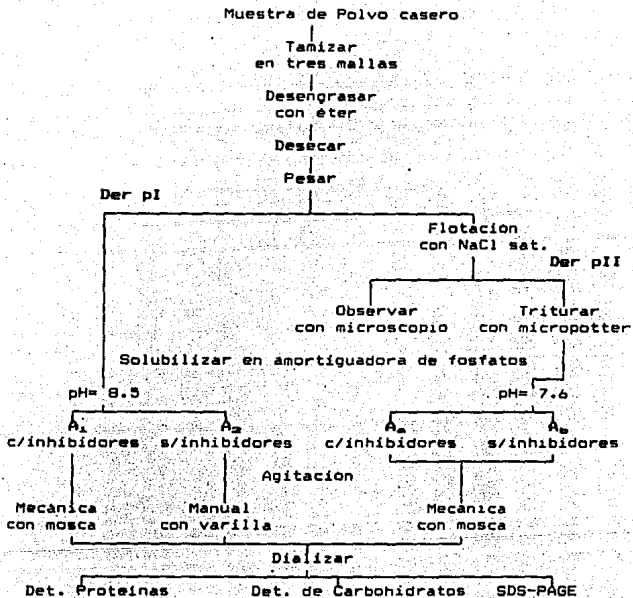


Fig. 2 Diagrama de flujo de las extracciones A, para determinar la utilidad de emplear inhibidores en la extracción de Der pI y Der pII, evaluándose por contenido de proteínas, carbohidratos y SDS-PAGE.

Metodología para comparar el tiempo y temperatura, en las extracciones B, de polvo casero para Der pi:

* La muestra de polvo casero se pulveriza con mortero para eliminar grumos, tamizar en mallas con diámetro de 0.25, 0.5 y 0.75 mm, en un vaso humedecer con acetona para desengrasar, decantar la acetona y secar a 37°C. Pesar dos fracciones de 11 g. Una solubilizarla en 110 ml de amortiguadora de boratos pH= 8.5, azida 0.1 %, inhibidores de proteasas (50 µg/ml), agitación mecánica por 2 horas a 20°C (B₁) y otra a 24 horas en refrigeración (B₂), centrifugar a 15000 g por 15 min.

La pastilla de B₁ solubilizarla en amortiguadora durante 17 horas en refrigeración (B_{1a}), Hacer lo mismo para la pastilla de B₂ (B_{2a}), centrifugar 15000 g por 15 min.

Dializar los extractos (en membranas de exclusión de 10 kDa bloqueadas con EDTA y Ca₂CO₃) en agua por 12 horas, después en amortiguadora 3 veces cada 3 horas.

Determinar proteínas y carbohidratos.

Concentrar las muestras en refrigeración, hasta un tercio del volumen original, en membranas de diálisis sin bloquear y dializarlas en membranas bloqueadas. Elaborar SDS-PAGE para los extractos

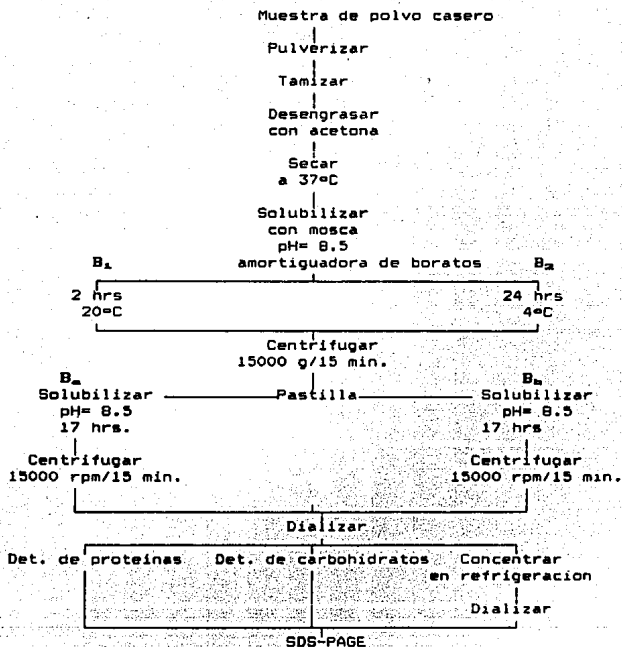


Fig. 3 Diagrama de flujo en las extracciones B, evaluando tiempo y temperatura para la extracción de Der pII, por determinación de proteínas, carbohidratos y por SDS-PAGE.

Metodología para la extracción C_1 de polvo casero y de extracto de nutrientes (E_m):

Extracto E_m : Pesar 15 g de levaduras, 2.5 g de uñas, 3 g de escamas dérmicas humanas y 2 g. de cabello humanos.

Extracto C_1 de polvo: pesar 16.1 g. de polvo. Las muestras se llevan a tamizar en malla 0.25 mm de diametro, se humedecen con éter para desengrasar, decantar el éter y secar a 37°C. Solubilizar por separado en 161 ml de amortiguadora de boratos pH= 8.5, azida 0.1 %, con inhibidores de proteasas, agitación mecánica, en refrigeración por 4 horas, centrifugar 14000 g por 15 min. Concentrar C_1 en refrigeración, dializar en membranas bloqueadas 12 horas en agua y tres veces cada 3 horas en amortiguadora. Elaborar SDS-PAGE en las muestras y comparar C_1 y E_m con los extractos comercial (Dp^c), purificado (Dp^p).

E_m
Levaduras, uñas,
escamas humanas
y pelo
pulverizados

C₁
Muestra de Polvo
casero pulverizado

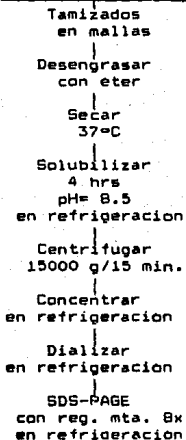


Fig 4 Diagrama de flujo de la extracción de polvo casero C₁ y de nutrientes (E_m) con las condiciones encontradas, para compararlas con extracto comercial (Dp^o) y el purificado (Dp^p), en SDS-PAGE.

Condiciones para separar e identificar proteínas de los extractos de polvo casero, en SDS-PAGE:

Limpiar las placas con detergente neutro, desengrasarlas con etanol al 10 %, colocar los separadores, sellar con agarosa; preparar por separado, el gel separador (12 %) y concentrador (8 %) de acuerdo al primer cuadro, agitar los reactivos; al gel separador agregarles el TEMED y persulfato, agitar e inmediatamente vaciar en las placas, dejar gelificar, después al gel concentrador agregarle el TEMED y persulfato agitar, vaciar en las placas, colocar el peine y dejar gelificar, retirar el peine.

| | 12.2% | 8% |
|--------------------------------|-------|------|
| Agua | 2.23 | 1.72 |
| Acrilamida-bisacrilamida | 3.64 | 0.93 |
| Amortiguadora gel separador | 3.0 | --- |
| Amortiguadora gel concentrador | --- | 0.85 |
| SDS 10 % | 0.24 | 0.06 |

| | | |
|----------------------|-------|-------|
| Persulfato de amonio | 0.075 | 0.030 |
| TEMED | 0.010 | 0.010 |

Colocar cables cátodo (-), ánodo (+), hacer precorrimento durante 10 min. Preparar las muestras a 20 o 35 µl de extracto con reguladora de muestra 2x (20 µl) o 8x (5 µl) respectivamente, hervirlas por 2 min, colocar las muestras en los pozos del gel, correr la electroforesis a temperatura ambiente o en refrigeración a 30 mA. Detener la electroforesis cuando el frente de azul de bromofenol se encuentre a 5 mm del borde inferior del gel, separar el gel de la cámara, teñirlo con Colorante Azul de Coomassie por 12 horas, desteñir con el decolorante I y después con el decolorante

II. Gráficar el Log. del Peso Molecular de los Marcadores contra el Rf de los mismos y apartir de los Rf de las proteínas de los extractos, determinar por extrapolación el P.M., los rangos y el número de proteínas.

SDS-PAGE:

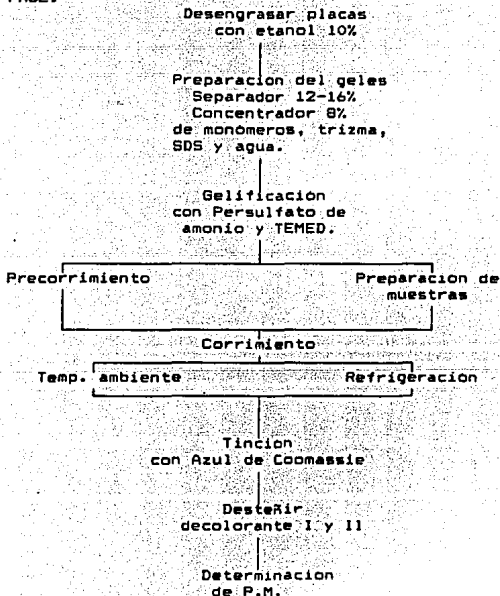


Fig. 5 Diagrama de flujo para establecer condiciones favorables en SDS-PAGE, al separar e identificar proteínas de los extractos de polvo casero.

6.0 Resultados

Las extracciones se efectuaron una vez para cada variante, se tomaron los resultados más representativos de las curvas estándares de proteínas, carbohidratos y de geles.

En las extracciones A, la determinación de proteínas, dio una ordenada al origen $b = 0.174$ y coeficiente de correlación de $r = 0.998$. En carbohidratos una $b = 0.114$ y $r = 0.991$; Las absorvancias de las muestras no fueron extrapolables, por lo que no se reportan cantidades en A_1 , A_2 , A_a y A_b .

En los geles de poliacrilamida las proteínas identificadas (Tabla 1), sin establecer su P.M. por falta de definición en los Marcadores, son: para el extracto comercial (Dp^*) y A_1 4 proteínas; A_2 , MP con 3; A_a , A_b 2 y Dp^* con una proteína. Las condiciones para los geles fueron concentración de monómeros de 12-12.4%, empleando reguladora de muestra 2x, corrimiento en temperatura ambiente, con amperaje constante de 30 mA, los geles no se conservaron y no se tomó foto.

Tabla 1 Comparación del número de proteínas en los extractos de Der pl, por SDS-PAGE, empleando reguladora de muestra 2x y 8x. A_1 = extracto de polvo casero con inhibidores de proteasas para Der pl. A_2 = extracto sin inhibidores. B_1 = extracto a temperatura ambiente por 2 hrs. B_1^r = extracto reconcentrado de B_1 . B_2 = extracto en refrigeración por 24 hrs. B_a = extracto de la pastilla de B_1 . B_b = extracto de la pastilla de B_2 . C_1 = extracto por 4 hrs, en refrigeración.

| | | Extracto | | | | | | | |
|---------------------|---------|----------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|
| | | A_1 | A_2 | B_1 | B_1^r | B_2 | B_a | B_b | C_1 |
| Numero de Proteinas | Reg. 2x | 4 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | -- |
| | Reg. 8x | -- | -- | 6 | 13 | 6 | 5 | 5 | 20 |

En las extracciones B (Tabla 2), la determinación de proteínas dio una $b = 0.054$ y $r = 0.999$, dando el extracto B_2 (con agitación de 24 horas y en refrigeración) más proteínas (7.73 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) que en B_1 (agitación de 2 horas a temperatura ambiente) (6.81 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). En la reextracción de B_1 ($B_a = 3.66 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), se obtuvo más proteínas, que en el reextracto de B_2 ($B_b = 1.49 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). El Dp^a dio un contenido de 40.30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y en el extracto purificado (Dp^b) dio una absorbancia muy baja que no pudo ser extrapolable.

En la determinación de carbohidratos se tiene una $b = -2.9^{-4}$ y $r = 0.999$; B_2 dio una absorbancia muy alta, en comparación a B_1 con 3.99 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de carbohidratos; en B_b hubo 2.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, más que en B_a (1.33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); mientras que en Dp^a dio de 3.53 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Tabla 2 Contenido de proteínas y de carbohidratos en las extracciones B, C, y comercial de polvo casero.

| | Extracto | | | | | | |
|---|----------|-------|-------------|-------|--------|-------------|-------|
| | B_1 | B_a | B_2 | B_b | Dp^a | Dp^b | C_1 |
| Proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 6.99 | 3.76 | 7.73 | 1.54 | 41.51 | $x < 11.41$ | 6.26 |
| Rendimiento (%) | 5.71 | 3.07 | 6.32 | 1.26 | --- | --- | 5.04 |
| Carbohidratos ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 3.99 | 1.33 | $x > 11.42$ | 2.3 | 3.53 | --- | |
| Rendimiento (%) | 3.26 | 1.08 | --- | 1.88 | --- | --- | |

En SDS-PAGE (fig. 6), la concentración del gel es de 12.0 %, a los extractos B_1 y B_2 (40 μl), con reguladora de muestra Bx (5 μl), se observaron 6 proteínas con intervalo, en peso

molecular (P.M.) de 14.9- 68.5 kDa, en B_a y B_b 5 proteínas con intervalo de 13.9 a 60.7 kDa (mas tenues). Con la reguladora 2x, los extractos B_1 y B_2 tienen 3 proteínas de P.M. 13.2, 30.8 y 33.1; para B_a y B_b también 3 proteínas (mas tenues) con P.M. de 12.9, 30.8 y 33.1 kDa. Los P.M. reportados en Der pI son 24-26 kDa, para Der pII de 14-15, en Der pIII de 29-31 y para Der pIV de 60 kDa; en los extractos, con reguladora de muestra Bx, las proteínas que tienen P.M. cercanos son: B_1 y B_2 de 14.9, 32.4 y 60.7 kDa; B_a y B_b de 13.9, 32.4 y 60.7 kDa. Con la reguladora 2x en B_1 y B_2 de 13.2 y 30.8 kDa y para B_a y B_b de 12.9 y 30.8 kDa.

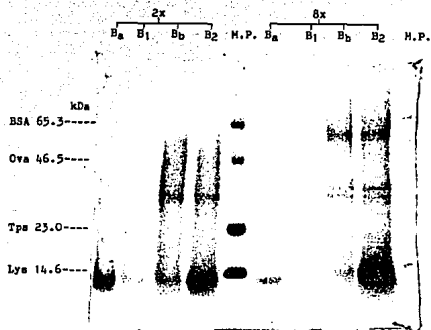


Fig. 6 Identificación de proteínas de las extracciones B, por SDS-PAGE (al 12 %), teñidos con Azul de Coomassie, empleando reguladora de muestra 2x y 8x. B_1 = extracto B, a temperatura ambiente/2 horas; B_2 = extracto B, en refrigeración/24 horas; B_a = reextracción de la pastilla B_1 ; B_b = reextracto de la pastilla B_2 ; M.P.= Marcadores de Peso Molecular; BSA= albumina serica bovina; Ova= Albumina de huevo; Tps= tripsinogeno; Lys= lisozima.

Al reconcentrar, una vez el extracto B_1 (Fig. 7) empleando reguladora de muestra 8x, se obtuvieron 13 proteínas con un intervalo de 11.3 a 74.7 kDa en concentración de 12.1 % de monómeros. Los posibles alérgenos en B_1 son de 13.6, 27.4, 30.7 y 58.7 kDa.



Fig. 7 Proteínas del extracto B reconcentrado (B_1^r) en SDS-PAGE (12.1 %), empleando reguladora de muestra 8x, teñidos con Azul de Coomassie. M.P.= Marcadores de Peso Molecular; BSA= albumina serica bovina; Ova= Albumina de huevo; Tps= tripsinogeno; Lys= lisozima.

En la extracción C_1 , se obtuvo 6.26 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína con un rendimiento de 5.04 %. Al comparar las proteínas de diferentes extractos en SDS-PAGE (Fig. 8), se observa que el extracto que obtuvimos del polvo casero (C_1) se contaron 20 proteínas con intervalo de P.M. de 7.5 a 122.9 kDa, en D_p se identificaron 18 proteínas con rango de P.M. de 7.5 a 114.6 kDa, en E_m se observaron proteínas con un intervalo de 7.5 a

114.3 kDa y en Dp^P hubo 6 proteínas con P.M. de 7.5 a 72.4 kDa. Al comparar los P.M. de los alérgenos reportados los más parecidos son: para Dp^C 24.1, 14.7, 28.8 y 62.9 kDa; en E_m se encontraron de 24.0, 14.5, 28.8 y 61.7 kDa; en Dp^P 14.2 y 29.9 kDa y en C₁ 24.9, 13.9, 30.9 y 61.7 kDa.

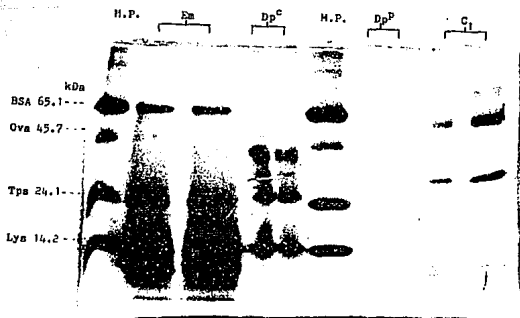


Foto 8 Comparación de proteínas del extracto C₁, con extracto de nutrientes (E_m), comercial (Dp^C) y purificado (Dp^P), de polvo casero; en SDS-PAGE, teñidos con azul de Coomassie. M.P.= Marcadores de Peso Molecular; BSA= albumina sérica bovina; Ova= Albumina de huevo; Tps= tripsinógeno; Lys= lisozima

Al comparar las proteínas que pueden ser semejantes en los extractos (Tabla 3), tenemos que: de las 20 proteínas de C₁ 8 son semejantes con proteínas de los demás extractos distribuyéndose de la siguiente manera 3 parecidas a Dp^C, 4 con E_m y 1 con Dp^P.

En las 18 proteínas de Dp^C 12 son parecidas a las de los demás extractos correspondiendo 8 con E_m, 1 de Dp^P y 3 de C₁.

De las 21 proteínas de E_m , 14 son parecidas a las proteínas de los otros extractos identificándose 2 de Dp^a , 4 de C_1 y 8 de Dp^c .

Y para Dp^a que tiene 6 proteínas, 4 son semejantes a las de los demás extractos, estando distribuidos de la siguiente manera 1 de C_1 , 1 para Dp^c y 2 para E_m .

Comparando el número de proteínas por SDS-PAGE (Tabla 1), se observan más, con las condiciones siguientes: uso de inhibidores (A_1) 4 proteínas; extracciones empleando reguladora de muestra Bx (B_1 y B_2), 6 proteínas; reconcentración a 1/3 del volumen (B_1^r), 13 proteínas y en la extracción C_1 20 proteínas.

Tabla 3 Comparación de proteínas del extracto C₁, por Peso Molecular, con diferentes extractos de polvo casero, en SDS-PAGE, teñidos con azul de Coomassie.

| E _m | Dp ^e | P.M. | Dp ^e | C ₁ |
|----------------|-----------------|------|-----------------|----------------|
| 114.3 | 114.8 | | | 122.9 |
| 106.3 | 103.2 | | | |
| 85.5 | 80.5 | | | 98.9 |
| | | | | 85.5 |
| | | | 72.4 | 79.5 |
| 68.8 | 67.5 | | 67.5 | 66.3 |
| | 62.9 | 65.1 | | |
| 61.7 | | | | 61.7 |
| 57.4 | | | | 57.4 |
| 49.6 | 54.5 | | | |
| | 45.7 | 45.7 | | 47.9 |
| | 42.6 | | | 44.5 |
| 42.9 | 42.6 | | | 37.1 |
| | 34.4 | | | |
| 33.3 | | | 33.2 | 30.9 |
| | | | 29.9 | |
| 28.8 | 28.8 | | | 24.9 |
| 25.8 | 25.9 | | | 20.8 |
| 24.0 | 24.1 | 24.1 | | |
| 20.0 | | | | |
| 18.6 | 18.8 | | | <u>17.3</u> |
| 16.7 | <u>16.9</u> | | | 16.1 |
| 15.5 | 14.7 | | | |
| 14.5 | | 14.2 | <u>14.2</u> | |
| 13.4 | <u>13.2</u> | | | <u>13.9</u> |
| | <u>11.5</u> | | | <u>12.9</u> |
| 10.8 | | | | <u>11.2</u> |
| | 9.6 | | | 10.4 |
| 8.7 | | | | |
| 7.5 | 7.5 | | 7.5 | 7.5 |
| 21 | 18 | 4 | 6 | 20 |

7.0 Discusión

En las extracciones A, la determinación de proteínas, en la curva estándar da una $b = 0.174$ y en carbohidratos de 0.144 que son muy altas, debido posiblemente a la presencia de proteínas o carbohidratos en los reactivos, por no caer las absorbancias de las muestras entre los intervalos de la curva estándar, no se reportan cantidades de proteínas y de carbohidratos, se considero diluir y aumentar la cantidad de muestra para que fueran extrapolables, lo cual no se llevo a cabo por falta de muestra. En el extracto A_1 , se observa un color negro, debido al carbón activado, usado para el cultivo del polvo casero, este carbón es liberado por la agitación mecánica, que es más drástica que la agitación manual.

La flotación, para observar al acaro sugiere emplear una solución de NaCl con densidad de 1.180, para eliminar el exceso de cristales que ocupan espacio y reflejan la luz.

En la extracción A_1 , por SDS-PAGE se observan 4 proteínas y en A_2 2 proteínas, debido posiblemente a los inhibidores de proteasas.

De las extracciones A, las mejores condiciones son el uso de inhibidores de proteasas y agitación mecánica, las cuales se emplean para las extracciones B, donde se comparan la extracción, en refrigeración por 24 hrs. y ambiental por 2 hrs; además de una concentración y diálisis de los extractos para estudiarlos en la electroforesis.

De las extracciones B, la determinación de proteínas, da una $b = 0.049$; las muestras, al extrapolarse son más

confiables para la comparación de los extractos. Las proteínas en D_p son más que en nuestros extractos y en D_p . La extracción a las 24 horas (B_2) es más favorable que a 2 horas (B_1), siendo también, posible causa, la refrigeración.

Las reextracciones de las muestras de polvo, contienen proteínas, en menor cantidad, teniendo B_2 más que B_1 , debido tal vez, a que durante la agitación de 24 horas se extrajo la mayor cantidad posible, dejando muy poca en el sedimento. La determinación de carbohidratos reafirma criterios respecto a la obtención de proteínas, salvo en B_2 donde se obtienen más carbohidratos que en B_1 , debido a un posible error en la preparación volumétrica (μ l) o interferencia de los inhibidores, en el análisis de B_2 .

En los geles de poliacrilamida, para observar e identificar, las proteínas presentes en los extractos, se trata de obtener proteínas de menos de 10 kDa (por el bloqueo de membranas de diálisis, de poro de exclusión de 10 kDa), concentrar las muestras, emplear una reguladora de muestra B_x , poner más cantidad de muestra en cada pozo, correr los geles en refrigeración; ya que así aumentaríamos su concentración en el gel y evitaríamos la degradación de proteínas por el exceso de calor en la microcamara.

Al reconcentrar los extractos, se forma un conglomerado macromolecular negro, planteandose dializar la muestra para eliminar las altas concentraciones de sales causantes de este fenomeno, lo cual resulto, en la disminucion de este complejo macromolecular y en los geles estas muestras mostraron más

cantidad de bandas proteicas. Por lo general para lograr resultados optimos se necesita la utilizacion de reactivos recién preparados, sin dejarlos almacenados mucho tiempo.

Teniendo algunas variables establecidas en la extraccion del polvo casero como triturar, tamizar, desengrasar, solubilizar en amortiguadora de boratos pH= 8.5 con azida 0.1 %, con inhibidores de proteasas, agitacion mecanica, en refrigeracion, efectuar concentracion y dialisis de los extractos se planteo hacer la extraccion C₁ y de nutrientes E_m, para comparar las proteinas con los extractos Dp^e y Dp^c por SDS-PAGE, al separar e identificar en P.M., el numero, su rango, semejanzas por P.M. y determinar los posibles alergenos, de cada extracto.

Algunas propuestas para posteriores estudios son el agregar más inhibidores de proteasas, que se reportan en la literatura, tales como aprotina, leupeptina, TLCK-HCL y TPCK, que inhiben serinas, cisteinas o tripsina, cuidando las especificaciones para cada reactivo, procurar en la extracción una agitacion mecanica no muy drastica, determinar proteinas por método de Bradford (que es más sensible y da un valor de hasta nanogramos), concentrar las muestras en membranas de dialisis de poro de exclusion de 1 kDa (para identificar posibles alergenos menores de 10 kDa) y dializar. Para identificar a Der p1, que se indica como una glicoproteina, teñir con reactivo de Schiff-PAS; para las proteinas hacerlo con el método de nitrato de plata que es más sensible que el Azul de Coomassie.

Una de las limitaciones para asegurar con precisión las técnicas de exxtracción es la realización de un mayor número de ensayos para determinar la reproducibilidad en la obtención de las proteínas, su cuantificación e identificación en SDS-PAGE.

El planteamiento secuencial elegido en las extracciones fue llevado a cabo apegados a criterios de elaboración de varios laboratorios y de acuerdo a nuestras condiciones de material, equipo y reactivos.

8.0 Conclusiones

1.- Con el uso de los inhibidores de proteasas, como un agente para la extracción del polvo casero, se obtiene una mayor cantidad de proteínas y mantiene la integridad de las proteínas en las extracciones del polvo casero.

2.- Una extracción durante 24 horas en refrigeración, es un factor donde se obtiene una mayor cantidad de proteínas, evitándose su posible degradación.

3.- En SDS-PAGE las condiciones que favorecieron la separación e identificación de las proteínas en los extractos son: concentración de monómeros de 12.0 a 12.1 %, empleo de reguladora de muestra 8x, corrimiento a 20 mA en refrigeración, concentración de los extractos a un tercio de su volumen, diálisis exhaustiva de las muestras concentradas. En los diferentes extractos por su P.M. se encuentran proteínas semejantes a los alérgenos reportados, Der pI 24 kDa, Der pII 14, Der pIII 30 y Der pIV 60 kDa.

9.0 Apéndice

- Azida de sodio 0.1 % (200 ml)

$$200 \text{ ml (0.1 g)} / 100 \text{ ml} = 0.2 \text{ g}$$

- Inhibidores de proteasas. De una mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF, NEM, PHMB), a concentración de 1025 $\mu\text{g/ml}$ preparar en solución amortiguada de 50 $\mu\text{g/ml}$

$$50 \text{ } \mu\text{g/ml (100 ml)} / 1025 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4.87 \text{ ml de Stock}$$

- Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH= 7.4 y 8.4 preparar de acuerdo a la siguiente formulación:

| | |
|---------------------------|---------|
| NaCl | 16.0 g. |
| KH_2PO_4 | 0.4 g |
| Na_2HPO_4 | 2.3 g |
| KCl | 0.4 g |

ajustar pH con NaOH 1N y aforar con agua desionizada a 2 Lts.

- Solución amortiguadora de Boratos 0.1 N, pH= 6.5 preparar de acuerdo a la siguiente formulación:

| | |
|-----------------------------------|--------|
| H_3BO_3 | 6.18 g |
| $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ | 9.54 g |
| NaCl | 4.38 g |

aforar a 1 litro con agua destilada.

- Reactivos para la determinar proteínas, Método de Lowry A

Solución A: carbonato de sodio 2% en NaOH 0.1 N

$$0.1 \text{ N (39.99 g)} (100 \text{ ml}) / 1 \text{ N (1000 ml)} = 0.3999 \text{ g de NaOH}$$

$$2\% (2 \text{ g}) / 100\% = 2 \text{ g de Na}_2\text{CO}_3$$

Solución B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5% en tartrato de sodio y potasio 1%

1 ml (0.5 g) / 100 ml = 0.005 g sulfato

1 ml (1.0 g) / 100 ml = 0.01 g tartrato

Reactivo de Lowry

Solución C: a 4.9 ml de la solución A agregarle 0.1 ml de la solución B

Procedimiento: preparar una serie de tubos, por duplicado de la siguiente manera:

| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--|-----|-----|------|------|------|------|
| Muestra (µl) | --- | --- | --- | --- | --- | 15.0 |
| ASB 1µg/µl (µl) | --- | 9.0 | 22.5 | 52.5 | 75.0 | --- |
| Soln C (µl) | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| Mezclar y dejar reposar por 10 minutos | | | | | | |
| Folin (µl) | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 |

mezclar y reposar por 30 min, leer la absorbancia a 750 nm.

- Reactivos para la determinación de Carbohidratos por el Método de Dubois

Fenol 5% 5 ml (5 g) / 100 ml = 0.25 g

Procedimiento: preparar una serie de tubos, por duplicado de la siguiente manera:

| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|--|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Glucosa (0.1µg/ml) | --- | 20 | 40 | 80 | 120 | 160 | 200 | --- |
| Muestra (µl) | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 200 |
| Aqua (µl) | 200 | 180 | 160 | 120 | 80 | 40 | --- | --- |
| Fenol (µl) | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |
| H ₂ SO ₄ conc.(µl) | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |

Mezclar y reposar por 5 min a 100°C en la oscuridad, sacar del baño reposar por 30 min a temperatura ambiente, en la oscuridad, leer a 490 nm

- Determinación de proteínas método de Lowry B

Preparar CuSO_4 1%

$$4.5 \text{ ml (1 g)} / 100 \text{ ml} = 0.045\text{g}$$

Tartrato de sodio y potasio 4%

$$2.5 \text{ ml (4 g)} / 100\text{ml} = 0.1 \text{ g}$$

NaOH 0.1N

$$0.1 \text{ N (39.99 g)} (103.4 \text{ ml}) / 1\text{N (1000 ml)} = 0.4134 \text{ g}$$

Na_2CO_3 3% en NaOH 0.1N

$$103.4 \text{ ml (3 g)} / 100\text{ml} = 3.102 \text{ g}$$

Se mezclan los reactivos y se dejan reposar (Reactivo A)

Preparar los sistemas, por duplicado según la tabla

| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ASB 10µg/ml(µl) | -- | 1 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 20 | -- |
| Muestra (µl) | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | 20 |
| Reactivo A (ml) | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Mezclar y reposar por 10 min | | | | | | | | | |
| Folin (1:2)(ml) | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |

mezclar, reposar por 30 min leer a 650 nm

- Reactivos para geles de poliacrilamida

Antes de preparar los reactivos y geles de poliacrilamida asegurarse que el material de vidriería y el equipo de electroforesis, haya sido lavado cuidadosamente y secado

* Solucion de acrilamida-bisacrilamida (30.8%)

Acrilamida 30.0 g
Bisacrilamida 0.8 g

diluir en agua, mezclar y aforar a 100 ml, filtrar en Whatman No 1 y refrigerar

* Reguladora del gel de separacion Tris-HCl 1.5M, pH= 8.8

Trizma base 18.15 ml
Agua dest. 90.0 ml

ajustar pH con HCl, aforar a 100 ml, filtrar y refrigerar.

* Reguladora del gel concentrador Tris-HCl 0.5 M, pH= 6.8

Trizma base 3.0 g
H₂O 40.0 ml

ajustar pH con HCl, aforar a 50 ml, filtrar y refrigerar.

* (SDS) 10 %: pesar 10 g y aforar a 100 ml.

* Persulfato de amonio 10%, se prepara al momento de usarse, pesar 10 g y aforar a 100 ml

* Reguladora de corrimiento; Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS 0.1%, pH= 8.3 no se ajusta

Trizma base 3 g
Glicina 14.4 g
SDS 10% 10.0 ml

* Reguladora de muestra

| | 2x | 8x |
|-----------------------------|------|------|
| Trizma 0.5/2 M pH= 6.8 (ml) | 1.25 | 1.25 |
| SDS 10/45 % (ml) | 2.0 | 1.75 |
| H ₂ O | 0.25 | --- |
| Glicerol | 1.0 | 1.5 |

a la reguladora agregale cristales de azul de bromofenol, el cual sera el frente durante el corrimiento

* Teñidor de proteínas

| | |
|----------------------------|----------|
| Azul de Coomassie R-250 1% | 62.5 ml |
| Metanol absoluto | 250.0 ml |
| Acido acético glacial | 50.0 ml |

agitar, aforar a 500 ml y guardar en recipiente oscuro.

* Decolorante I

| | |
|-----------------------|--------|
| Metanol | 500 ml |
| Acido acético glacial | 100 ml |

aforar a 1000 ml

* Decolorante II

| | |
|-----------------------|-------|
| Metanol | 50 ml |
| Acido acético glacial | 70 ml |

aforar a 1000 ml

- Bloqueo de membranas para la diálisis

Para obtener proteínas de menos de 10 kDa, se bloquean los poros de las membranas, de la siguiente manera:

- Cortar el tubo de diálisis a la longitud deseada.
- Hervir en un gran volumen de NaHCO_3 2% y EDTA 1 mM.
- Enjuagar perfectamente con agua destilada.
- Hervir 10 min en EDTA 1mM.
- Dejar enfriar y guardar a 4°C sumergidos en la solución.
- Antes de usar, lavarlos por dentro y fuera con agua.

EDTA 0.001M

$(292.24 \text{ g}) (500 \text{ ml}) / 1 \text{ M} (1000 \text{ ml}) = 0.1461 \text{ g}$

10.0 Glosario

Alergeno: sustancia específica biológicamente activa, provoca reacciones de hipersensibilidad inmediata.

Alergia: manifestación patológica por una respuesta alterada de la defensa al liberar aminas vaso activas produciendo asma, rinitis, dermatitis o choque anafiláctico.

Atopia: se relaciona con alergias donde hay una predisposición genética a reaccionar con proteínas ambientales.

Célula cebada: son células de defensa perivascular que se encuentran en el tejido conectivo, tienen receptores específicos para Fc de IgE.

Electroforesis: migración de partículas por una solución bajo la influencia de un campo eléctrico

Extracto: son sustancias solubles presentes en una muestra que se separan por el uso de solventes.

Hipersensibilidad: mecanismo de inmunidad que puede dar lugar a procesos peligrosos y no siempre de protección, ocasionando lesiones histológicas en los tejidos propios.

Reagina: término empleado para describir una sustancia termolábil del suero relacionada con la hipersensibilidad inmediata, ahora se conoce como IgE.

11.0 Bibliografía

- 1.- Angel G.M. Interpretación Clínica del Laboratorio 3ª Edn. Ed. Médica Panamericana Bogotá Colombia 42-5,111-2 1990
- 2.- Barret J.T. Inmunología Médica 5ª Edn. Ed. Interamericana McGraw Hill Mex. D.F. 16:307-42 (1990)
- 3.- Carro B. C. Correlación entre pruebas cutáneas y los niveles séricos de IgE total y específica en pacientes atópicos Tesis Q.F.B. Fac. Química UNAM Mex. D.F. 1988
- 4.- Carswell F. State of the art: mite and human allergy. Immunology 65(4):497-500 (1988)
- 5.- Castor P.L. Estandarización de alérgenos Tesis Q.F.B. Fac. Química UNAM Mex. D.F. (1987)
- 6.- Chapman D.M. and Platts-Mills A.E.T. Purification and characterization of the major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus* antigen P1 J. immunology 125(2):587-91 (1980)
- 7.- Chapman D.M; Wheyman P; Wilkins R.S; Brown J.M. and Platts-Mills A.E.T. Monoclonal immunoassays for major dust mite allergens Der pI and Der fI and cuantitative analysis of the allergen content of mite and house dust extracts J. Allergy Clin. Immunol. 80(2):184-94 (1987)
- 8.- Dandeu J.P; Le Mao J; Lux M; Rabillon J. and David B. Antigen and allergens in *Dermatophagoides farinae* mite Immunology 46(4):679-87 (1982)

9.- Deards M.J. and Montague A.E. Purification and characterization of a major allergen of *Alternaria alternata* Mol. Immunol. 28(4/5):409-15 (1991)

10.- Deuell B; Arruda K; Hayden M; Chapman D.M and Platts-Mills A.E.T. *Trichophyton tonsurans* allergen characterization of a protein that causes immediate but not delayed hypersensitivity J. Immunol. 147(1):96-101 (1991)

11.- Edwards B.T; Trudeau L.W; Fernandez C.E; Lee K.D; Seleznic J.M. and Lockey F. Richard Proteinases in extracts of the storage mite *Aleuroglyphus ovatus* J. Allergy Clin. Immunol. 90(1):129-31 (1992)

12.- Farrerons F.J. Alergia y Paraalergia España Barcelona España 19-25;27-39 (1989)

13.- Finkelman D. F. IL-4 is required to generate and sustain *in vivo* IgE responses. J. Immunology 141(7):2335-41 (1988)

14.- Fireman P. and Slavin G. R. Atlas of allergies Gower Medical Publishing New York-1.2-1.23, 3.2-3.12 (1991)

15.- Garcia-Ortega M.P. Lo fundamental en alergia Ediciones Doyma Barcelona España 1-13, 23-8, 61-5 (1986)

16.- Griffin P; Ford A. and Tooping M.D. Allergenic and antigenic relationship between three species of storage mite and the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* J. Allergy Clin. Immunol. 84(1):108-17 (1989)

17.- Haida M. and Okadaira H. Allergens of the house dust mite *Dermatophagoides farinae* immunochemical studie or four

allergenic fractions J. Allergy Clin. Immunol. 75(6):686-92 (1985)

18.- Hallas T. The biology of Mites Allergy 46(11):6-9 (1991)

19.- Heyman W.P; Chapman D.M. and Platts-Mills A.E.T. Antigen Der f1 from the dust mite *Dermatophagoides farinae*: estructural comparison with Der pI *Dermatophagoides pteronyssinus* and epitope specificity of murine IgG and human IgE antibodies J. Immunology 137(9):2841-7 (1986)

20.- Holk A; Dale S. and Sletten K. Purification and characterization of a major allergen from the house dust mite *Dermatophagoides farinae*. Allergy 41(6):408-17 (1986)

21.- Ino Y; Ando T; Haida M; Nakamura K; Iwaki M; and Miyamoto T. Characterization of the proteases in the crude mite extract Inter. Arch. Allergy Appl. Immunol. 87(4):321-6 (1989)

22.- International workshop Report Dust mite allergens and asthma a worldwide problem Bolletin of World Health Organization 66(6):769-80 (1988)

23.- Jeannin P; Didierlaurent A; Gras-Masse H. and Pestel J. Specific histamine release capacity of peptides selected from the modelized Der pI protein, a major allergen of *Dermatophagoides pteronyssinus* Mol. Immunology 29(6):739-49 (1992)

24.- Karlsson-Borga and Rolfsen Methodological consideration when using nitrocelulose imunoblotting form poliacrilamide gel to study the mould allergens *Aspergillus*

fumigatus and *Alternaria alternata* J. Immunol. Methods
136:91-102 (1992)

25.- Lake R.F; Ward D.L; Simpson J.R; Thompsn J.P. and
Stewart A.G. House Dust mite-derived amylase: allergenicity
and physicochemical characterization J. Allergy Clin.
Immunol. 87(6):1035-42 (1991)

26.- Lawlor J.G. and Fischer J.T. Manual of allergy and
immunology Second Edition Little Brown and Company Spiral
Manual Boston United States of America 17-41,43-53,55-60
(1988)

27.- Lehrer B.S; Horner E.W; Menom K.P; Oliver J. and Hauck
P. Cockroach allergenic activity analysis of commercial
cockroach and dust extracts J. Allergy Clin. Immunol.
88(6):895-901 (1991)

28.- Le M; Weyer A. and David B. Studies on
Dermatophagoides pteronyssinus allergen Dp42 of the house
dust mite measurement of the relativis potencies of the
Dermatophagoides pteronyssinus purified extracts by *in vitro*
and *in vivo* methods J. Allergy Clin. Immunol. 65(5):381-8
(1980)

29.- Lind P. Demonstration of close physicochemical
similarity and partial immunochemical identity between the
major allergen Dp42 of the house dust mite *Dermatophagoides*
pteronyssinus and correspondin antigens of *Dermatophagoides*
farinae (Df6) and *Dermatophagoides microceras* (Dm6) Int.
Arch. Allergy Appl Immunol. 79:60-5 (1986)

30.- Lind P. and Lowestein H. Identification of allergens in the *Dermatophagoides pteronyssinus* mite body extracto by crossed Radioimmuno-electrophoresis with two different rabbit antibody pools Scand. J. Immunol. 17(3):263-73 (1983)

31.- Lockey F.R. y Bukantz C.S. Inmunología y alergia Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina 13-25,73-83. (1988)

32.- Luczynska M.C; Arruda K; Platts-Mills A.E.T; Miller D.J; Lopez M. and Chapman D.M. A two-site monoclonal antibody ELISA for the cuantification of the major *Dermatophagoides spp* allergens Der p1 and Der f1 J. Immunol Methods 118:227-35 (1989)

33.- Muñoz L.F. Alergia respiratoria en la infancia y la adolescencia Ediciones Doyma, Madrid España, 3-21,57-62, (1987)

34.- O'Brien M.R; Thomas R.W. and Wootton M.A. T cell responses to the purified major allergens from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* J. Allergy Clin. Immunol. 89(5):1021-31 (1992)

35.- Pene J. IgE production Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 85(17):6880-4 (1988)

36.- Peralta A.M.R. Reactividad cutanea a aeroalergenos en pacientes con alergias respiratorias Tesis Q.F.B Facultad de Química UNAM Mex. D.F. 1992

37.- Perrin F.L. Manual de alergología practica Ed. Masson Barcelona España 3-22, 161-3, (1985)

38.- Platts-Mills A.E.T. and Chapman D.M. Dust mites: immunology, allergic disease and environmental control J. Allergy Clin. Immunol. 87(2):621-5 (1991)

39.- Platts-Mills A.E.T. and David B. Cross-reaction and species-specific determination on a major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* development of a RIA for antigen P1 in house dust mite and dust mite extracts J. Allergy Clin. Immunol 78(3):398-406 (1986)

40.- Platts A.E.T. and Weck A. Dust mite allergen and asthma a world wide problem J. Allergy Clin. Immunol. 83(1):416-27 (1989)

41.- Roit I; Brostoff J. and Male D. Inmunologia 2a Edición Ed Salvat Barcelona España 12:253-75 (1991)

42.- Rose R.N. y Friedman H. El laboratorio en la inmunología clínica Ed. Panamericana Argentina 105:866-9 (1984)

43.- Sagun P.A. Presencia de endotoxinas microbianas en alergenosis Tesis Q.F.B. Fac. Química UNAM Mex D.F. 1986

44.- Servín V.R. Estudio de *Dermatophagoides pteronyssinus* en el D.F. y su relación con alergias al polvo doméstico Tesis Biología ENCB IPN Mex. D.F. 1979

45.- Siltan P.R; Fernández C.E; Swanson C.M. and Lockey F.R. Prevalencia of specific IgE to the storage mite a *Leuroglyphus ovatus* J. Allergy Clin. Immunol. 88(4):595-603 (1991)

46.- Stewart G.A; Ward I.D. and Simpson R.J. The group III allergen from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* is a trypsin-like enzyme *Immunology* 75(1):29-3 (1992)

47.- Theobald-Segalen C. y Benveniste J. ABC de Técnicas de Diagnóstico en Alergología Ed. Masson España 1-58 (1986)

48.- Thompson S.J. and Carswell The major allergen of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* is synthesized and secret in to its alimentary canal *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 83(5):312-5 (1988)

49.- Tovey E.R; Chapman M.D. and Platts-Mills A.E.T. Mite faeces are a major source of house dust allergen *Nature* 87(5798):592-3 (1981)

50.- Tovey R.E; Chapman D.M; Wells W.C. and Platts-Mills A.E.T. The distribution of dust mites allergens in the house of patients with asthma *Am. Rev. Resp. Dis.* 124(5):630-5 (1981)

51.- Weck L; Stadler B.M. and Dahinder C.A. New perspectives in the modulation of allergic inflammation *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 90(1):17-21 (1989)

52.- Yasueda H; Mita H; Yui Y. and Shida T. Comparative analysis of the physicochemical and immunochemical properties of the two major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus* and the correspondin allergens from *Dermatophagoides farinae* *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 88(3):402-7 (1993)