



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
"ISMAEL COSÍO VILLEGAS"

"Estudio aerobiológico *in situ* de alérgenos fúngicos de enfermedades respiratorias"

T E S I S

Para obtener el Título de:
ESPECIALISTA EN ALERGÍA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA

PRESENTA

Dra. Dulce María Aguilar Flores

ASESORES DE TESIS:

Dr. Luis Manuel Terán Juárez
Dr. Josaphat Miguel Montero Vargas



CIUDAD DE MÉXICO, 12 DE SEPTIEMBRE DEL 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Dr. Juan Carlos Vázquez García.

Director de Enseñanza.

Dra. María Del Carmen Cano Salas.

Subdirectora de Enseñanza.

Dra. Dayanna Lorelly Álvarez Monter.

Titular del Departamento de Formación de Posgrado.

Dr. Luis Terán Juárez.

Profesor Titular de La Especialidad en Alergia e Inmunología Clínica.

Dr. Josaphat Miguel Montero Vargas.

Asesor de Tesis.

Agradecimientos

Mi principal agradecimiento es a Dios quien nunca me ha dejado sola y me ha acompañado a lo largo de mi carrera.

A mi esposo Carlos, mi hija Ximena y mis padres Dinorah y José Luis ya que sin ellos nada de esto sería posible, gracias por nunca dejarme caer y ser mis principales motivadores y formadores de lo que soy hoy como persona y profesionalista. Este logro sin duda también es de ustedes.

A mis profesores el Dr. Fernando Ramírez y el Dr. Gandhi Pavón por enseñarme todo lo que sé y guiarme a ser mejor profesionalista, sin duda fueron una red de apoyo invaluable.

Al Departamento de investigación de micología, a Gabriel Palma y Víctor Hernández, ya que sin ellos este proyecto no se hubiera podido realizar, su aportación en este proyecto fue crucial.

A mis asesores de tesis el Dr. Josaphat Montero y el Dr. Luis Manuel Terán por permitirme aportar algo a la investigación, por su entrega y ayuda durante el protocolo, a todo el servicio de Investigación de Inmunogenética.

Y, por último, pero sin ser menos importante a todos mis compañeros residentes que se convirtieron en mis amigos y familia durante dos años.

Gracias a todos, nada de esto sería posible sin ustedes.

Contenido

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	VI
RESUMEN.....	¡Error! Marcador no definido.
1.MARCO TEÓRICO	1
1.1 HONGOS	1
1.2 ALERGIA A LOS HONGOS	2
1.3 HONGOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ALÉRGICAS.....	5
1.3.1 <i>Aspergillus</i> spp.	6
1.3.2 <i>Penicillium</i> spp.....	7
1.3.3 <i>Fusarium</i> spp.....	8
1.3.4 <i>Cladosporium</i> spp.....	9
1.3.5 <i>Helminthosporium</i> spp.	11
1.3.6 <i>Mucor</i> spp.....	12
1.3.7 <i>Alternaria</i> spp.....	13
1.3.8 <i>Candida</i> spp.	14
1.3.9 <i>Rhizopus</i> spp.....	14
1.4 EPIDEMIOLOGÍA.....	15
1.5 FACTORES DE RIESGO PARA MICOSIS BRONCOPULMONAR ALÉRGICA	17
1.5.1 Asma	17
1.5.2 Fibrosis quística	18
1.5.3 Otros factores de riesgo	18
1.6 FISIOPATOLOGÍA DE MICOSIS BRONCOPULMONAR ALÉRGICA	19
1.7 GENERALIDADES ALÉRGENOS	20
1.7.1 NOMENCLATURA DE ALÉRGENOS	22
1.7.2 PROTEÍNAS ALERGÉNICAS	22
1.8 DIAGNÓSTICO	24
1.9 TRATAMIENTO	28
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
3. JUSTIFICACIÓN.....	31
4. OBJETIVOS.....	32
5. HIPÓTESIS.....	32
6. MATERIALES Y MÉTODOS	33
6.1 DISEÑO DE ESTUDIO.....	33

6.2	DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	33
6.3	DEFINICIÓN OPERACIONAL DE VARIABLES	34
6.4	CONSIDERACIONES ÉTICAS	35
6.5	PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO	36
8.	RESULTADOS	44
9.	DISCUSIÓN.....	57
10.	CONCLUSIONES	61
11.	ANEXOS.....	63
12.	REFERENCIAS	72

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Imagen <i>Aspergillus</i>	7
Figura 2. Imagen <i>Penicillium</i>	8
Figura 3. Imagen de <i>Fusarium</i>	9
Figura 4. Imagen de <i>Cladosporium</i>	11
Figura 5. Imagen de <i>Helminthosporium</i>	12
Figura 6. Imagen de <i>Alternaria</i>	14
Figura 7. Porcentaje de sensibilización a hongos en en pacientes pediátricos mexicanos con condiciones alérgicas, separados por edad, años 2004 vs 2018.	16
Figura 8. Fisiopatogenia.	20
Figura 9. TAC de tórax (ventana pulmonar) de aspergilosis alérgica pulmonar.	26
Figura 10. Diagrama de flujo realizado para la obtención de antígeno y dilución de preceptinas..	39
Figura 11. Diagrama de flujo para extracción de proteínas a partir de antígeno.	40
Figura 12. Diagrama de flujo con generalidades para extracción de DNA	42
Figura 13. Porcentajes de identificación macroscópica.	47
Figura 14. Producto de PCR a partir de DNA extraído de colonias extraídas de precipitinas positivas	49
Figura 15. Análisis y alineamiento de secuencias de DNA.	50
Figura 16. Patrón electroforético de las 3 muestras (42, 46 y 48) de S3 teñidas con azul de Coomassie.	51
Figura 17. Patrón electroforético de la muestra 42,46,48 con inmunotransferencia	52
Figura 18. Porcentaje de identificación microscópica de S2.....	53
Tabla 1. Alérgenos descritos en OMS/IUIS.....	22
Tabla 2. Criterios diagnósticos de múltiples asociaciones y consensos descritos hasta la actualidad.	24
Tabla 3. Definición operacional de variables	34
Tabla 4. Características demográficas de los pacientes seleccionados.	45
Tabla 5. Características demográficas de los pacientes seleccionados.	45
Tabla 6. Resultados de pruebas cutáneas y/o intradérmicas, IgE total y serología de hongos.	46
Tabla 7. Resultados de precipitinas S1.	48
Tabla 8. Resultados de cuantificación de extracción de proteínas de S3.	48
Tabla 9. Resultados de precipitinas de S2 en las 4 diluciones.	53
Tabla 10. Resultados de cuantificación de proteínas con método 2-D Quant de S2.	54
Tabla 11. Resultados de precipitinas de S1 en las 4 diluciones implementadas.	55

RESUMEN

Introducción: La OMS estima que al menos un 25% de la población padece de enfermedades respiratorias alérgicas, siendo los hongos una de las causas principales de exacerbaciones. A nivel mundial los aeroalérgenos fúngicos más prevalentes provienen de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Alternaria*. Las enfermedades respiratorias fúngicas como el asma con sensibilidad a hongos, la rinosinusitis fúngica alérgica y la micosis broncopulmonar alérgica no están tan bien definidas como otras alergias, por lo que suelen ser más difícil de diagnosticar en relación con otros aeroalérgenos.

Objetivos: Búsqueda de hongos intradomiciliarios aislados *in situ* en hogares de pacientes con sospecha de micosis broncopulmonar alérgica (MBPA).

Materiales y métodos: Se trabajó en el INER (Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”) con pacientes sospechosos de MBPA sin sensibilidad alérgica documentada. Se enrolaron 3 pacientes a quienes se les realizaron pruebas cutáneas y/o intradérmicas, y perfil de precipitinas de pool básico en el Departamento de Micología. Se realizó un monitoreo ambiental pasivo en cajas de Petri, después de la incubación se realizó una caracterización de cultivos microscópicamente y de precipitinas individuales. De las precipitinas positivas se recuperó el antígeno y se realizó una extracción proteica para posteriormente realizar una cuantificación de proteínas, electroforesis unidimensional y Western-Blot 1-D. Así mismo se realizó la extracción de DNA para la secuenciación e identificación de cada especie.

Resultados: Los 3 pacientes fueron originarios del sur de la Ciudad de México, el 100% de ellos tuvo presencia de moho visible en sus hogares, y el 66.6% reportó goteras en éstas. El sexo predominante fue masculino en el 66.6%, con una mediana de edad 21 años (rango de edad, 15 a 65 años). Microscópicamente las especies encontradas fueron de los géneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* y en varias sólo se lograron observar conidios e hifas por lo que no fueron posible identificar los géneros. Las pruebas cutáneas y/o intradérmicas fueron positivas a *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Candida*, *Hormodendrum* y *Helminthosporium*. Se lograron aislar 70 cultivos morfológicamente diferentes. Del primer paciente 9 de 20 cultivos fueron positivos a precipitinas de las cuales logramos extracción de proteína en 3 muestras. Se obtuvieron bandas de proteínas de unión a IgE en las 3 muestras con un peso molecular entre 11 kDa y >100 kDa. De las 9 muestras se realizó amplificación por PCR de regiones ITS y secuenciación, en 7 de ellas se logró identificar las especies de *Rhizopus stolonifer*, *Phlebia subserialis*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium nygamai* y *Penicillium crustosum*. Se logró confirmar MBPA en 1 de nuestros pacientes asociada a hongos aislados en su domicilio.

Conclusiones: Se logró confirmar el diagnóstico de micosis broncopulmonar alérgica causada por *Rhizopus stolonifer* y *Penicillium crustosum* en 1 de nuestros pacientes a través de clínica, pruebas cutáneas, precipitinas, secuenciación y estudios de inmunoproteómica.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 HONGOS

El reino de los hongos está conformado por organismos uni- o pluricelulares, eucariotas, heterótrofos, cosmopolitas, que pueden reproducirse sexual y/o asexualmente, que poseen diversidad de estructuras, funciones, formas de crecimiento y estilos de vida. Los hongos son organismos que tienen un núcleo definido y que poseen características similares a las plantas y los animales. Sus células son alargadas y al alinearse unas con otras forman filamentos denominados hifas, las cuales al entrelazarse forman una masa similar al algodón llamada micelio. A estos hongos se les denomina filamentosos. No obstante, algunos hongos pueden estar formados por una sola célula; es el caso de las levaduras (1–3).

Los organismos que pertenecen al linaje de los hongos incluyen setas, royas, trufas, mohos y levaduras, así como otros organismos menos conocidos. Pueden encontrarse en cualquier región del mundo, se han descrito alrededor de 100,000 especies, pero se estima que puede existir un número total de 1.5 millones de especies (4,5).

Las características fundamentales de los hongos son:

- Todos son heterótrofos (quimiorganotrofos) por lo que tienen que alimentarse de materia orgánica preformada que usan como fuente de energía y de carbono.
- Son eucariontes.
- Tienen una membrana celular conformada por ergosterol; así como una pared celular formada por polisacáridos, polipéptidos y quitina (que le confiere propiedades antigénicas); esta pared es rígida, por lo que no pueden fagocitar partículas alimenticias, sino que absorben nutrientes simples y solubles.

- La estructura fúngica consta de un complejo llamado talo o micelio que a su vez está constituido por múltiples filamentos o hifas (hifomicetos o mohos) conformados por una sucesión de células intercomunicadas o por estructuras unicelulares o levaduras (blastomicetos).

1.2 ALERGIA A LOS HONGOS

El término alergia fue acuñado en 1906 por Von Pirquet para describir una reactividad alterada en los seres vivos (hipersensibilidad mediada por IgE) causada por una sustancia extraña (alérgeno) (6).

Las enfermedades alérgicas se caracterizan por tener una etiología en la que participan factores genéticos y ambientales. La expresión clínica de estas enfermedades es la generación de respuestas de hipersensibilidad mediadas por IgE específica contra alérgenos. La manifestación más común de atopia es la alergia respiratoria, e incluye a la rinitis alérgica y al asma alérgica, que con frecuencia coexisten (6).

La enfermedad alérgica de tipo I a los alérgenos fúngicos se manifiesta normalmente como rinitis (fiebre del heno) o como asma. Las reacciones alérgicas, incluida la alergia respiratoria, pueden ocurrir en dos fases. La reacción de fase temprana ocurre en cuestión de minutos como resultado de la liberación de mediadores preformados. Las respuestas de fase tardía ocurren 3 a 4 horas después de la exposición al alérgeno como resultado de infiltrados celulares que responden a los mediadores de fase temprana. Una reacción dual involucra tanto reacciones de fase temprana como tardía. La evidencia emergente indica que un componente inflamatorio significativo y persistente, además de los efectos desencadenados por IgE, subyace a la etiología del asma (1).

Los hongos han sido identificados como causa de una serie de enfermedades infecciosas e históricamente se han asociado a enfermedades alérgicas respiratorias por su alto potencial alérgeno.

Los alérgenos más frecuentemente implicados en la etiología de la alergia respiratoria son los aeroalérgenos intra y extradomiciliarios (6). Siendo los más frecuentes: las proteínas del ácaro (*Dermatophagoides*) y cucarachas, pólenes (árboles, pastos y malezas), esporas de hongos y epitelios de mascotas (7,8).

La alergia fúngica no está tan bien definida como otras alergias, suele ser más difícil de diagnosticar con relación a otras ya que los hongos son mucho más numerosos y tienen mayor variación antigénica que otros alérgenos, además son extremadamente difíciles de evitar. Por lo tanto, el diagnóstico y tratamiento de la alergia fúngica puede ser un desafío clínico importante (1).

Múltiples especies micóticas son conocidas por causar enfermedades respiratorias, siendo este un problema mundial. Las esporas pueden ser encontradas intramuros y extramuros, sin embargo, la exposición repetida e inhalación de esporas fúngicas puede ser causante de enfermedades respiratorias alérgicas (9,10). Ejemplos de ello son:

- **Asma con sensibilidad a hongos:**

El asma es una afección inflamatoria que compromete la vía aérea, caracterizada por hiperreactividad de vías respiratorias, broncoconstricción aguda y crónica, además de edema de vías respiratorias y taponamiento mucoso (11). Constituye la enfermedad respiratoria más frecuente en niños y adultos. El ambiente es uno de los varios factores que influyen en el desarrollo y severidad del asma. Estudios y metaanálisis han reconocido que la exposición a hongos intradomiciliarios puede estar asociada con el desarrollo y empeoramiento del asma. Los hongos más frecuentemente involucrados con el asma son de los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Candida*, *Mucor*, *Penicillium* y *Cladosporium*. Particularmente *A. alternata* y *C. herbarum*, constituyen un factor de riesgo para el asma severa. Existen estudios que demuestran la asociación entre el aumento de los niveles atmosféricos de esporas fúngicas y el incremento de exacerbaciones. Estas

esporas son, en parte, responsables de las exacerbaciones del asma (12–14).

- **Rinosinusitis alérgica fúngica**

Es un subtipo de rinosinusitis crónica con pólipos nasales que se desarrolla en paciente atópicos inmunocompetentes. Fue descrita inicialmente hace más de una década por Millar y Lamb denominada inicialmente “Aspergilosis sinusal alérgica” debido a la similitud histopatológica con la Aspergilosis broncopulmonar alérgica (16). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que la mayoría de los casos con esta entidad eran causadas por especies distintas a *Aspergillus*. Los pacientes cuentan con niveles de IgE total elevada e IgE específica para hongos positiva. Generalmente se presenta como un cuadro que no remite y con hallazgos graves en TAC como erosión ósea de las paredes de los senos paranasales (15).

- **Aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA)**

Se define como una enfermedad pulmonar causada por hipersensibilidad alérgica Th2 debida a la colonización de *Aspergillus fumigatus* (16).

- La aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) es causada por *A. fumigatus*, teniendo una prevalencia del 1-8% en pacientes con asma y ocurre especialmente en adultos. En pacientes con fibrosis quística (FQ) se manifiesta principalmente en niños mayores y adultos con un rango de 6-25%, aunque existen otras series que han publicado prevalencia tan baja como del 2.7%. La prevalencia aumenta en pacientes mayores de 6 años, con función pulmonar disminuida e infección crónica por *Pseudomonas aeruginosa*. Además, se asocia a la colonización por *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Candida albicans*. *Aspergillus fumigatus* se aísla con relativa frecuencia en el esputo de pacientes con FQ (9-57%); sin embargo, la sola presencia de este agente no indica necesariamente el diagnóstico (17). La colonización por *Aspergillus* en pacientes con FQ se ha

reportado en 7.8 a 18%, con una prevalencia de ABPA de 4.7% (17). **Micosis broncopulmonar alérgica (MBPA)**

Es una enfermedad inflamatoria causada por alergia a antígenos micóticos que forman colonias en el árbol traqueobronquial. Casi siempre ocurre en personas con asma atópica o FQ de 20 a 40 años de edad, en respuesta a antígenos micóticos (18).

La MPBA es causada por una reacción de hipersensibilidad (asociado a tipo I y III) a hongos ambientales, siendo el más común *Aspergillus fumigatus*, sin embargo, se ha descrito en asociación a otros agentes etiológicos de los géneros *Candida*, *Schizophyllum*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Saccharomyces*, *Trichosporom*, etc. Esta entidad fue descrita inicialmente por Hinson y colaboradores en Reino Unido, cuando en 1952 describieron una serie de pacientes asmáticos con infiltrados pulmonares recurrentes, eosinofilia periférica y cultivos positivos para *Aspergillus fumigatus* (19,20).

Los datos clínicos en pacientes con MBPA incluyen opacidades pulmonares y bronquiectasias en pacientes con asma. El diagnóstico y manejo oportuno de esta entidad puede permitir la prevención de las complicaciones.

Actualmente el principal grupo de estudio de esta entidad está constituido por la Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal (ISHAM) (21).

1.3 HONGOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ALÉRGICAS

Entre los agentes específicos que han sido reportados como agentes etiológicos de MBPA se han reportado: *A. niger*, *Helminthosporium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus ochraceus*, *Semphylium* spp., *Aspergillus terreus*, *Drechslera* spp., *Torulopsis* spp., *Mucor-like* spp., *Candida* spp., *Pseudallescheria* spp., *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp., *Schizophyllum* spp., *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp., *Saccharomyces* spp., entre otros (21).

Algunos de los hongos más importantes en México, desde el punto de vista alergológico, por su elevada cantidad en el ambiente y potencial alergénico, pertenecen a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Candida*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Hormodendrum*, *Monilia*, *Mucor*, *Penicillium* y *Rhizopus* (22).

1.3.1 *Aspergillus* spp.

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729 por P. A. Micheli, se dio este nombre debido a que la cabeza conidial de este hongo se parecía a un "aspergillum" (instrumento utilizado para dispersar agua bendita). *Aspergillus* es un hongo filamentoso hialino ubicuo, perteneciente al filo Ascomycota, su reservorio puede ser el suelo, vegetales, materia orgánica en descomposición, alimentos (granos, cereales, frutos) y agua, contando con la característica de sobrevivir a temperaturas desde los 12 °C a los 57 °C. Se conocen alrededor de 900 especies de *Aspergillus*, que se clasifican en diversos grupos de las cuales algunos son: *Aspergillus fumigatus* (85%), *A. flavus* (5-10%), *A. niger* (2-3%), *A. terreus* (2-3%), *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. glaucus*, *A. clavatus*, *A. cervinus*, *A. candidus*, *A. flavipes* y *A. ustus* (23). Una característica microscópica del género son las cabezas aspergiliares (Figura 1).

Respecto a las enfermedades ocasionadas por *Aspergillus* spp., éstas se clasifican en saprofitas (aspergiloma), alérgicas (sinusitis y aspergilosis broncopulmonar alérgica), neumonitis por hipersensibilidad e invasivas (aspergilosis invasiva) (24).

Aspergillus fumigatus libera una gran variedad de proteínas, ácidos orgánicos y ácidos grasos, incluyendo superóxido dismutasas, catalasas, proteasas, ribotoxinas, fosfolipasas, hemolisinas, gliotoxinas y otras toxinas, las cuales tienen un efecto directo en el epitelio pulmonar y la inflamación por macrófagos. Varias de las proteínas de *Aspergillus* tienen una actividad biológica significativa que ataca la integridad epitelial e induce una respuesta inflamatoria. Esta actividad de proteasa permite una mayor exposición del tejido broncoalveolar linfoide a los alérgenos (16).

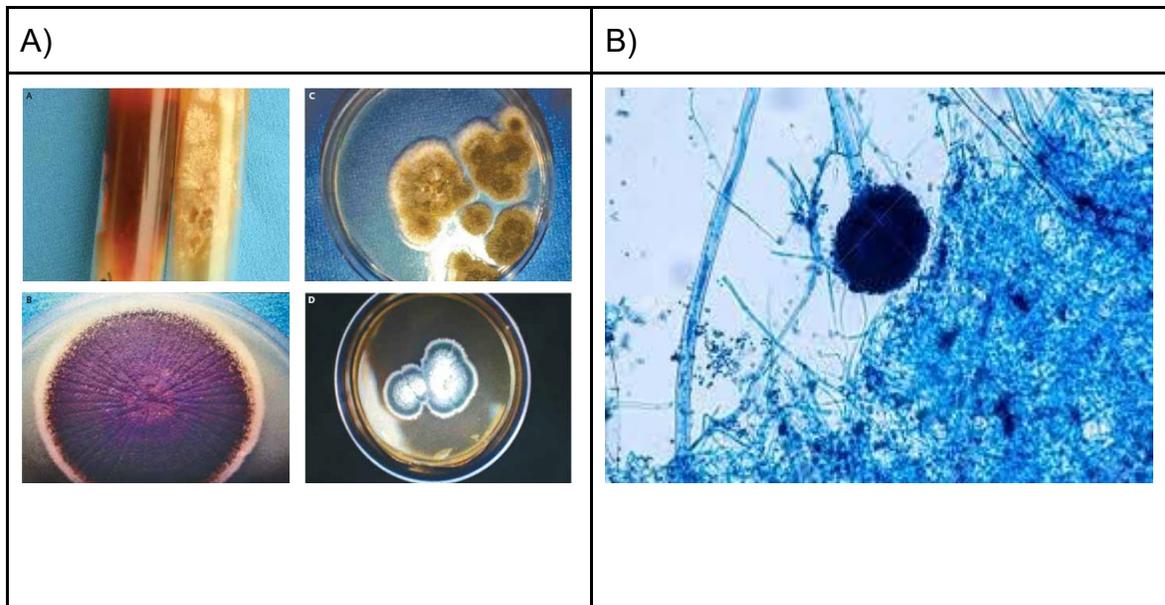


Figura 1. A) Imagen macroscópicamente de diferentes colonias del género *Aspergillus*. B) Filamentos, cabezas aspergilaes y esporas (Imagen obtenida de: *Micología Médica Ilustrada*. Arenas. 5ta edición (25)).

1.3.2 *Penicillium* spp.

El género *Penicillium* presenta un conidióforo constituido por un pedicelo y un cepillo o peine (penicilios) con un patrón de ramificaciones diversas. Pueden ser monoverticilados, biverticilados, triverticilados, cuadvérticilados o poliverticilados, donde se incluyen estructuras tales como ramas, ramillas, métulas, fiálides y conidios. Es quizás, el género más ubicuo de todos, con gran cantidad de especies, la mayoría de las cuales son saprobias, algunas patógenas de importancia médica y otras de importancia industrial o económica (26). Entre las especies más comunes están: *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. janthinellum*, *P. notatum*, *P. viridicatum* y *P. purpurogenum*, de las cuales *P. chrysogenum* y *P. notatum* son utilizadas para la producción de antibióticos como la penicilina. El género *Penicillium* ocasionalmente induce casos de infección en humanos, lo que se conoce como peniciliosis, y se presenta en pacientes inmunodeprimidos.

En promedio, los hongos del género *Penicillium* pueden representar hasta el 35% de la microbiota del suelo y está muy extendido en las regiones templadas,

sin embargo, el moho puede transportarse por el aire, agua y los insectos, colonizando fácilmente cualquier superficie o material (27). Se encuentra dentro de los tres hongos más comunes en suspensión en el aire (junto con *Aspergillus* y *Cladosporium*), es de las especies más propensas a causar síntomas de alergia (27).

Microscópicamente la textura puede ser plana de coloración inicial blanca y con el tiempo adquiere color azul verdoso, gris o tonos rosados. Microscópicamente presenta hifas hialinas, los conidióforos tienen ramas secundarias de forma cilíndrica, paredes lisas y portan de 3 a 6 fiálides (Figura 2) (36).

Penicillium tiene una frecuencia de 5.6% como agente de sensibilización alérgica en pacientes mexicanos con rinitis alérgica (28).

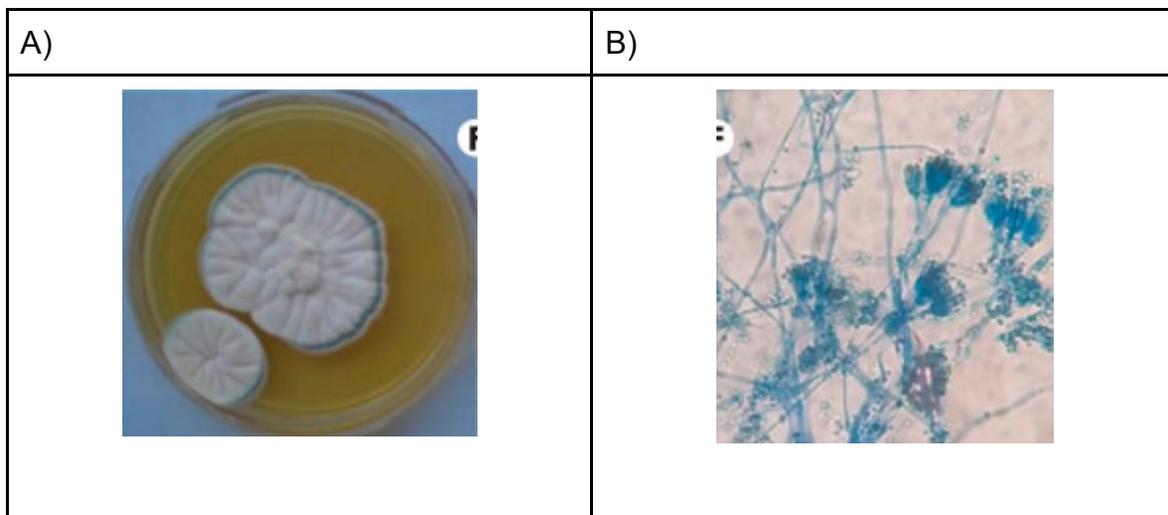


Figura 2. A) Imagen macroscópica con textura plana y color blanco de *Penicillium*. B) Imagen de características microscópicas a 40x de *Penicillium* (Imagen obtenida de: *Micología Médica Ilustrada*. Arenas. 5ta edición (25)).

1.3.3 *Fusarium* spp.

Las diferentes especies de *Fusarium* son cosmopolitas, pudiendo ser recuperadas de muestras ambientales (suelo, plantas, materia orgánica, etc.) o conducciones de agua (grifos, duchas, lavabos, etc.).

Macroscópicamente tiene un crecimiento rápido con micelio aéreo con coloración variable de blanco o rosado durazno, algunos con tinte de color intenso de la

colonia. Microscópicamente con esporas unilaterales, sin septos con conidióforos poco ramificados (Figura 3) (29).

La mayoría de las infecciones por *Fusarium* se adquieren por inhalación de conidios; no obstante, el mayor tamaño de estas (comparadas con las de *Aspergillus*) hace que este mecanismo de transmisión sea más infrecuente que en la aspergilosis (30). *Fusarium* se ha relacionado con infecciones invasoras en pacientes inmunocomprometidos (31).

Respecto a su relación con sensibilización alérgica, se conoce que es uno de los hongos más importantes desde el punto de vista alergológico, por su elevada cantidad en el ambiente y potencia alergénica, aunque en nuestro país se ha reportado una baja frecuencia de sensibilización a este agente (28).

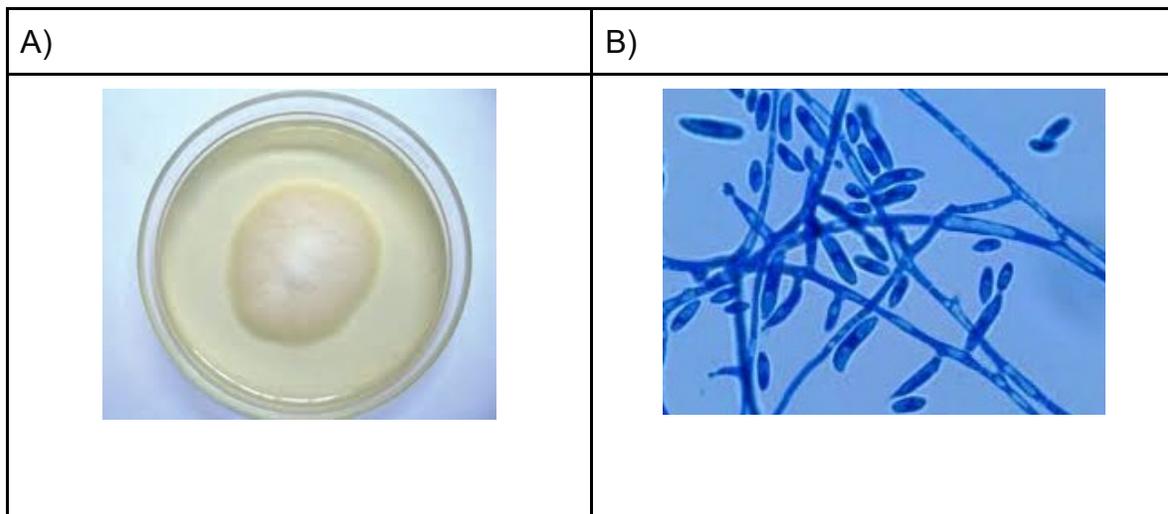


Figura 3. Imagen de *Fusarium*. A) Imagen macroscópica de *Fusarium*. B) Imagen microscópica de *Fusarium* (Imagen obtenida de: *Micología Médica Ilustrada*. Arenas. 5ta edición (25)).

1.3.4 *Cladosporium* spp.

Cladosporium es un hongo filamentoso, perteneciente al filo Ascomycota y al grupo de los dematiáceos, caracterizados por presentar una coloración oscura (25).

Es un hongo saprófito, normalmente se encuentra colonizando las plantas o en el suelo. Puede crecer en paja y madera húmeda, alimentos, combustibles fósiles,

cosméticos (cremas), pinturas, plásticos, papel y tejidos (ropa, alfombras, cuero) (25).

Su temperatura óptima de crecimiento es de 18 °C a 28 °C, la mayoría de las especies no crecen a temperaturas superiores a 35 °C, pero algunas como *C. herbarum* pueden crecer a bajas temperaturas hasta los -6 °C. Normalmente requieren humedad relativa alta del 80% al 90%, aunque especies como *C. carrionii* pueden crecer con baja humedad relativa y colonizar plantas xerófilas. Tiene una distribución mundial, aunque algunas especies predominan en zonas de clima tropical y subtropical (sin embargo, *C. carrionii* crece principalmente en zonas áridas) (25).

Las esporas se encuentran en forma de bioaerosol en el aire, principalmente a finales de verano y principios de otoño, sobre todo en zonas templadas, siendo de los principales un contaminante habitual en los edificios o en los lugares de trabajo (25).

Microscópicamente presenta hifas finas, septadas, ramificadas de color hialino a marrón. Las hifas sostienen cadenas ramificadas de conidios unicelulares, elipsoides o cilíndricos, algunos con forma de escudo debido a las cicatrices de unión entre ellos. Los conidios se forman por gemación sucesiva del conidio anterior, encontrándose el conidio más joven y pequeño al final de la cadena (25). Macroscópicamente forma colonias aterciopeladas, pulverulentas o vellosas, con pliegues radiales, de color blanco o crema que tienden a oscurecerse en tonos verde oliva y, a veces, gris verdoso o marrones (Figura 4) (25).

Su frecuencia como agente de sensibilización alérgica en pacientes mexicanos se ha reportado en 13.89% (28).

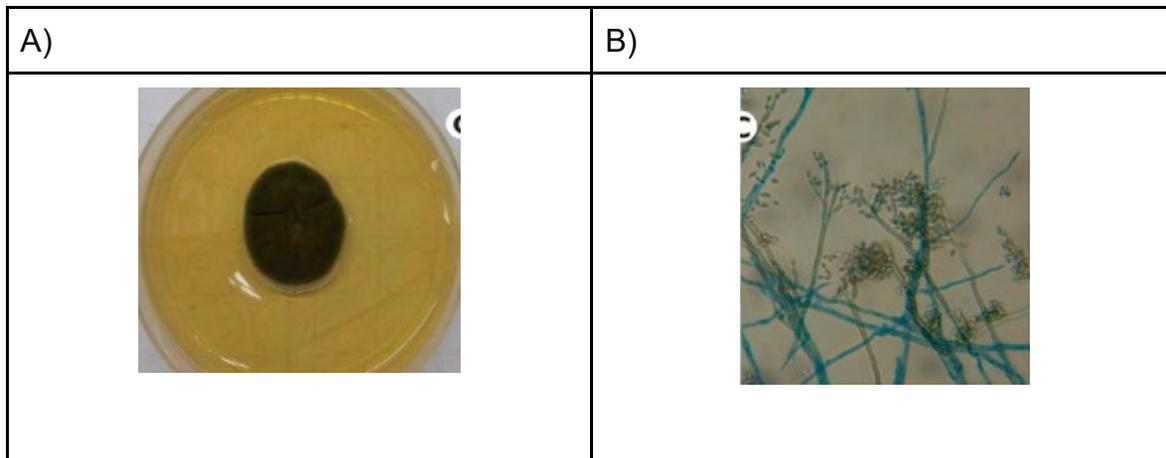


Figura 4. Imagen de *Cladosporium*. A) Imagen macroscópica de *Cladosporium*. B) Características microscópicas (40X) de *Cladosporium* (Imagen obtenida de: *Micología Médica Ilustrada*. Arenas. 5ta edición (25)).

1.3.5 *Helminthosporium* spp.

Los hongos del género *Helminthosporium* afectan trigos, avenas, cebadas. *H. solani* es un hongo que afecta cultivos como papa. Se ha reportado su presencia en países tropicales de Latinoamérica incluyendo México, Cuba, Venezuela, Colombia, Brasil, Bolivia y Perú. El hongo ataca exclusivamente a los tubérculos. El hongo pertenece al orden de los Pleosporales de los Ascomicetos. A temperaturas entre 15 a 25 °C y una humedad atmosférica alta (90%) se estimula la germinación de los conidios. Ninguna otra especie de planta, excepto la papa, es conocida como hospedera de *H. solani*, mientras tanto el hongo puede sobrevivir un tiempo determinado en diferentes sustratos, por ejemplo en hojas muertas de avena (32) .

Tiene una superficie grisácea o verdosa, que generalmente se torna de color negro. Está constituido por hifas septadas por conidióforos también septados, algunas veces ramificados, de color oscuro, con una característica apariencia nodosa, torcida, al final de la cual se encuentra los conidios, que son morenos, elongados y contienen en su interior dos o más células, dando la apariencia de huevos de helmintos (Figura 5) (10).

En México, se ha reportado una frecuencia de sensibilización de pacientes alérgicos a *Helminthosporium* en 20.6% (6).

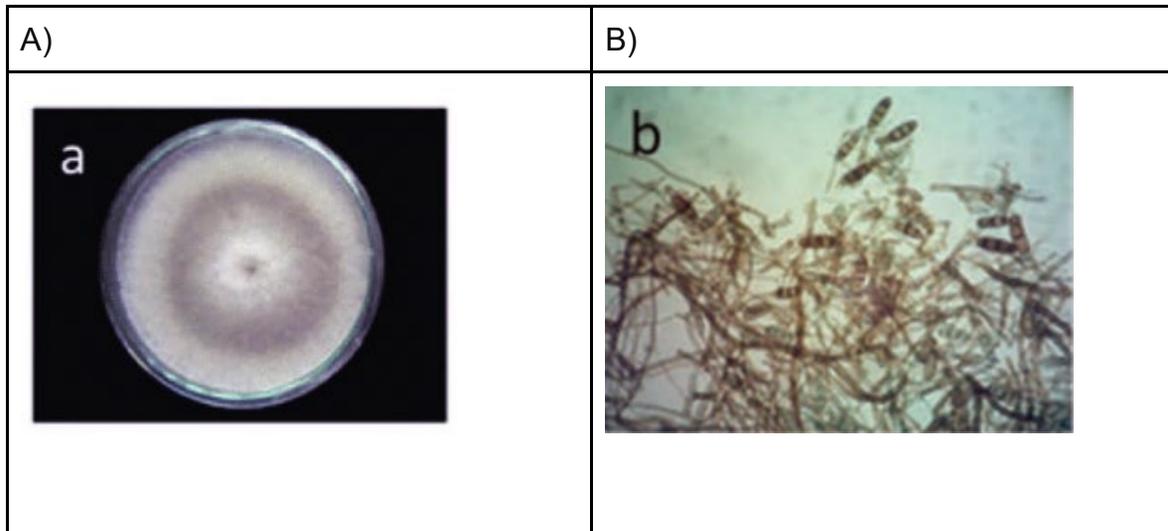


Figura 5. Imagen de *Helminthosporium*. A) Imagen macroscópica de *Helminthosporium*. B) Características microscópicas (40x) de *Helminthosporium* (33).

1.3.6 *Mucor* spp.

Hongos del género *Mucor* habitan comúnmente en el suelo, material vegetal en descomposición y edificios. Sin embargo, también se informa su presencia en tejidos humanos y animales. Como muchas otras especies de Mucorales, *M. racemosus* es capaz de cambiar de una forma filamentosa a una forma de levadura. Esta adaptación morfogénica llamada dimorfismo permite que este moho coloniza rápidamente a un huésped y es un factor esencial de su patogenicidad (10).

La superficie de crecimiento es un micelio algodonoso, blanco, con hifas no septadas. Tiene esporangióforos largos que se ramifican y presentan esporangios redondos, terminales, llenos de esporas (10).

En niños alérgicos mexicanos, un estudio realizado en Michoacán, se reportó una frecuencia de sensibilización a *Mucor racemosus* de 3 a 4% (34). En pacientes con

rinitis alérgica mayores a 10 años, se reportó una prevalencia de sensibilización de acuerdo con prueba de Prick de 4.6% para *Mucor* (28).

1.3.7 *Alternaria* spp.

Alternaria es un género fúngico muy común, donde se incluyen numerosas especies saprofitas, endofíticas y patógenas ampliamente distribuidas en el suelo y la materia orgánica en descomposición, así como en el aire. *Alternaria* spp. Es un hongo dematiáceo, perteneciente al orden Pleosporales, familia Pleosporaceae. El género *Alternaria* spp. abarca cientos de especies. Las especies más frecuentemente aisladas en humanos son: *A. alternata*, *A. chartarum*, *A. dianthicola*, *A. infectoria*, *A. stemphyloides*, *A. tenuissima* y *A. longipes* (35).

A nivel microscópico se observan hifas septadas dematiáceas, conidióforos septados con pared lisa o rugosa, simples o simpodiales con varios poros de inserción y, conidios únicos o en cadenas acropétalas con forma ovoide u obclavada, septados longitudinal y transversalmente. El final del conidio, cerca del conidióforo es redondo, mientras que se estrecha hacia el ápice. Macroscópicamente se observan colonias oscuras, grises, marrones o negros (Figura 6) (35,36).

En pacientes mexicanos con rinitis alérgica se ha reportado prevalencia de sensibilización a *Alternaria* de 10.2% (28). En adultos mayores con procesos alérgicos, se documentó una prevalencia de sensibilización a *Alternaria* de 6.7% (37).

A)	B)
----	----

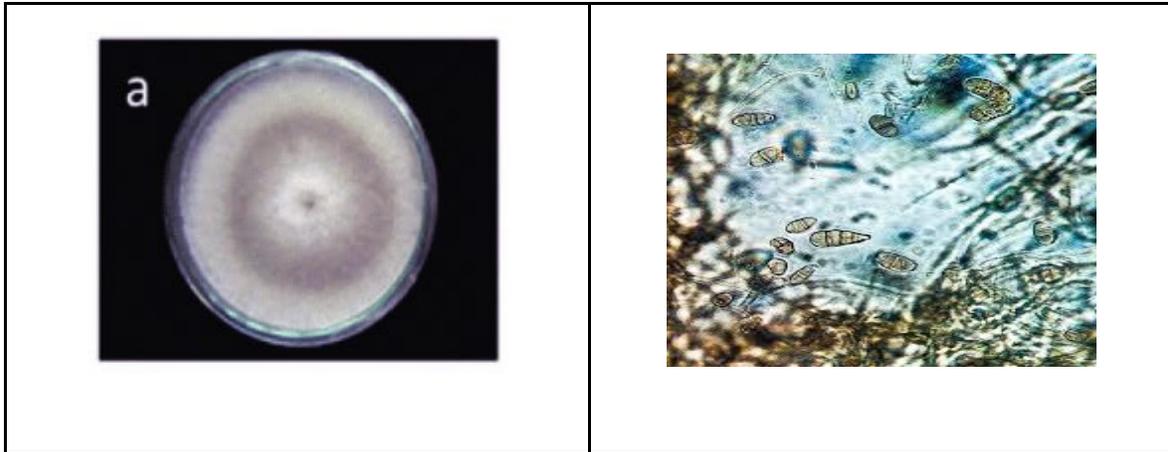


Figura 6. Imagen de *Alternaria*. A) Imagen macroscópica de *Alternaria*. B) Características microscópicas (40X) de *Alternaria* (38).

1.3.8 *Candida* spp.

Candida albicans es un hongo unicelular también llamado levadura que pertenece al filo Ascomycota, tiene un aspecto de células redondas y ovaladas de 3-8 por 2-7 micras. Normalmente es un hongo comensal de las superficies mucosas oral, gastrointestinal, genital y piel (39). Es la especie responsable de la mayoría de las infecciones humanas causadas por patógenos fúngicos, la temperatura de crecimiento va de 25°C a 37°C, tiene la característica de ser dimórfico lo que le permite evadir mecanismos de defensas relacionados con la inmunidad celular del huésped (39).

En México, se ha reportado prevalencia de sensibilización de pacientes alérgicos a *Candida* de 65.7%, siendo el principal agente fúngico causante de sensibilización alérgica en algunos reportes mexicanos, incluyendo pacientes con rinitis alérgica mayores de 10 años, pacientes con alergia respiratoria y también en pacientes adultos mayores (28,37).

1.3.9 *Rhizopus* spp.

Es un hongo de crecimiento muy rápido, que madura en 3 a 4 días cubriendo totalmente la superficie del medio, con una colonia de superficie algodonosa, que al principio es blanca y que posteriormente se cubre con pequeños puntos oscuros que corresponden a esporangióforos, la temperatura de crecimiento varía de 25°C

- 30°C y tiene la característica de crecer principalmente en frutas maduras como el melón y el melocotón (10).

Microscópicamente está constituido por hifas gruesas, no septadas, con numerosos estolones que corren entre ellas conectando grupos de esporangios grandes, generalmente no ramificados. En los puntos en donde los estolones y los esporangios se encuentran, se presentan hifas en forma de raíces que constituyen los rizoides (10).

Se ha descrito en México una prevalencia de sensibilización a *R. nigricans* de 3.0% en pacientes con alergia respiratoria (6).

1.4 EPIDEMIOLOGIA

La sensibilidad alérgica fúngica no se encuentra identificada, sin embargo, se estima del 3% al 10% de la población general (40).

Diversos estudios efectuados en otros países han evaluado la prevalencia de la sensibilización a hongos en personas alérgicas, existen pocos reportes a este respecto en México (6,34,40). Los resultados de estos diferentes estudios epidemiológicos muestran una gran variabilidad en la prevalencia de sensibilización a hongos en pacientes con alergia respiratoria (6).

A nivel mundial los aeroalérgenos fúngicos más prevalentes son *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Alternaria* (40).

Un estudio realizado en el Centro Regional de Alergia e Inmunología Clínica en Monterrey en México analizó la prevalencia de sensibilización a hongos en 4,880 pacientes mediante pruebas cutáneas. Reportó una prevalencia de sensibilización a hongos en pacientes con alergia respiratoria de 17.1%. La especie de hongo más prevalente fue *Alternaria alternata* con 5.5%, seguida de *H. sativum* en 4.8%, *H. cladosporioides* 3.8%, *A. fumigatus* en 3.2%, *P. chrysogenum* 3.1%, *R. nigricans* 3.0%. El límite de edad con mayor prevalencia a sensibilización fue el de 0-10 años con 6.7% (6).

Un estudio sobre patrones de sensibilización alérgica en pacientes pediátricos mexicanos evaluó a 8,794 pacientes de 2 a 18 años con condiciones alérgicas y resultados de pruebas cutáneas efectuadas entre 2004 y 2015. Se reportó que 41.6% de los pacientes eran residentes de Ciudad de México, 51.6% del área metropolitana del Estado de México y 6.7% de otras regiones del país. El diagnóstico más frecuente fue rinitis alérgica en 69.7%, seguido de asma en 42.9% y dermatitis atópica en 41% (40). El 14% de los pacientes tuvo un resultado negativo a todo el panel de alérgenos fúngicos ambientales. Los 7,565 individuos restantes, correspondientes al 86% de la población estudiada, presentaron sensibilización a por lo menos un hongo, siendo el más frecuente el *Aspergillus* en 16.8%. El porcentaje de sensibilización fue similar en el grupo de edad de menores a 6 años y mayores de 6 años. El segundo hongo con mayor frecuencia de sensibilización fue *Candida albicans* en 16.0%, y después *Alternaria* en 13.9%. El panel de sensibilización fúngica también incluyó *Cladosporium herbarum* cuyo porcentaje de sensibilización fue 13.0%, *Mucor mucedo* 11.3% y *Penicillium notatum* 12.8% (40).

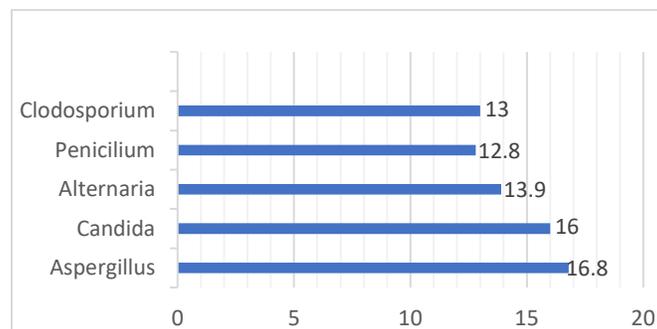


Figura 7. Porcentaje de sensibilización a hongos en pacientes pediátricos mexicanos con condiciones alérgicas, separados por edad, años 2004 vs 2018 (40).

Existen reportes de Sudáfrica, Irlanda, Nueva Zelanda, Arabia Saudita y China sugieren que el 2.5% de los pacientes adultos con asma presentan MBPA, sin embargo, la prevalencia es superior en el sur de Asia, especialmente en la India, con especial atención en centros de referencia neumológica (41). Actualmente en México no se ha descrito la prevalencia de MBPA.

1.5 FACTORES DE RIESGO PARA MICOSIS BRONCOPULMONAR ALÉRGICA

La susceptibilidad para padecer aspergilosis broncopulmonar alérgica/ micosis broncopulmonar alérgica está mediada por respuestas inflamatorias determinadas genéticamente. Dentro de los factores de riesgo más importantes se encuentran los siguientes:

1.5.1 Asma

Se define por la GINA (Iniciativa Global para el asma) como una enfermedad heterogénea, caracterizada por inflamación crónica de la vía aérea inferior que está asociada a una hiperrespuesta bronquial, así como obstrucción variable y reversible de la vía aérea (42).

Se han identificado numerosos factores de riesgo para el asma, en gran parte a través de estudios de asociación. Entre los factores de riesgo para asma se encuentran: Antecedente familiar de asma, factores de la dieta materna durante el embarazo, incluyendo ingesta baja materna de Vitaminas C, D, E y de zinc, aumento de peso excesivo durante el embarazo, deficiencia de vitamina D, uso de antibióticos durante el embarazo, ausencia de lactancia materna, tabaquismo materno, prematurez, preeclampsia, obesidad, tabaquismo, exposición ocupacional (43).

Se ha reportado que 1 a 2% de los pacientes con asma cursa con ABPA. Estos casos se caracterizan por exacerbaciones de asma asociados a infiltrados radiográficos pulmonares recurrentes y eosinofilia periférica. En este grupo de pacientes es común encontrar hifas de *A. fumigatus* en esputo cuando cursan con exacerbación aguda de ABPA (16).

1.5.2 Fibrosis quística

La fibrosis quística (FQ) es un trastorno multisistémico causado por mutaciones patogénicas del gen CFTR (regulador de la conductancia transmembrana de la FQ). Los síntomas y signos típicos incluyen infección pulmonar persistente, insuficiencia pancreática y niveles elevados de cloruro en el sudor. Sin embargo, muchos pacientes muestran síntomas leves o atípicos. El diagnóstico de FQ se basa en el hallazgo de anomalías genéticas y/o funcionales del gen CFTR (44).

Un organismo que puede causar colonización sin infección invasiva es *Aspergillus fumigatus*. Una respuesta alérgica intensa a este hongo produce la ABPA, que se observa en 1 a 15 % de los pacientes con fibrosis quística, con una frecuencia que varía geográficamente. La prevalencia de MBPA en pacientes con FQ producida por otros agentes etiológicos no han sido claramente determinada (45).

El primer reporte de asociación de ABPA y FQ se realizó en 1965. La ocurrencia de ABPA en FQ se asocia a deterioro de la función pulmonar, a tasas más altas de colonización microbiana, neumotórax, hemoptisis masiva y a un mal estado nutricional. Un elemento clave en la inmunopatogénesis puede ser la exposición a altos niveles de alérgenos de *Aspergillus* debido a las características anormales de las secreciones pulmonares. El reconocimiento de ABPA en FQ puede ser difícil debido a que la ABPA y la FQ en mal control comparten varias características clínicas (21).

1.5.3 Otros factores de riesgo

Se han propuesto algunos factores genéticos como factores de riesgo para MBPA. En el caso específico de ABPA se ha reportado que los pacientes asmáticos o con FQ que expresan HLA-DR2 y/o DR5 (y tal vez HLA-DR4 o DR7) y quienes no tienen HLA-DQ2 tienen un riesgo incrementado de desarrollar ABPA después de la exposición a *A. fumigatus* (16). Otros estudios han reportado que la presencia de HLA-DQ2 provee protección para el desarrollo de ABPA. Estos resultados

genotípicos son similares a los encontrados con alérgenos de ácaros del polvo doméstico purificado (16,46) Sin embargo, poseer ciertos genotipos puede ser necesario, pero no suficiente para causar ABPA (16).

1.6 FISIOPATOLOGÍA DE MICOSIS BRONCOPULMONAR ALÉRGICA

En individuos genéticamente predispuestos, la inhalación de conidio de *A. fumigatus* o cualquier otro hongo persiste y germina en hifas con liberación de antígenos que comprometen el aclaramiento mucociliar, estimular la barrera epitelial y actividad la actividad inmune innata de los pulmonares (21).

La hipersensibilidad se ha caracterizado inmunológicamente en cuatro tipos de reacciones sobre la base de la presentación clínica y los mecanismos subyacentes, siendo la hipersensibilidad tipo I y tipo III las relacionadas a esta patología. La hipersensibilidad tipo I se desencadena por la interacción de antígenos específicos de inmunoglobulina E (IgE), que se denominan alérgenos, con IgE en la superficie de mastocitos o basófilos, se sabe que en los pacientes con micosis broncopulmonar alérgica, es en pacientes asmáticos y/o fibrosis quística que presentan una eliminación defectuosa de las conidios lo que permite germinar hifas y expone proteínas fúngicas a través de sus receptores de reconocimiento de patrones y eliminan parcialmente los hongos (47).

Posterior al crecimiento fúngico se produce la exocitosis de varias proteínas, seguido de liberación de quimiocinas y citocinas, activando la respuesta inmunitaria adaptativa de las células Th (47).

La respuesta habitual del huésped es la respuesta de células T (Th1 CD4+) que elimina los hongos secundarios a fagocitosis mediada por macrófagos y neutrófilos, a diferencia de la ABPA/MBPA que es una respuesta principalmente mediada por células T (Th2 CD4+) (47).

La reacción habitual del huésped son liberación de interleucina IL-4, IL-5, IL-13, CCL17, IL-9 y otras (31) . La respuesta Th2 no erradica los hongos, sin embargo,

causa una inflamación caracterizada por la desgranulación de los mastocitos y la entrada de gran cantidad de eosinófilos y neutrófilos (9) Esto provoca los hallazgos inmunológicos (IgE total y específica del hongo causante) y patológicos (taponamiento mucoso, bronquiectasias) característicos de la ABPA/ MBPA. La inflamación persistente conduce a bronquiectasias y, si no se controla, fibrosis pulmonar y enfermedad respiratoria en etapa terminal (Figura 8) (47).

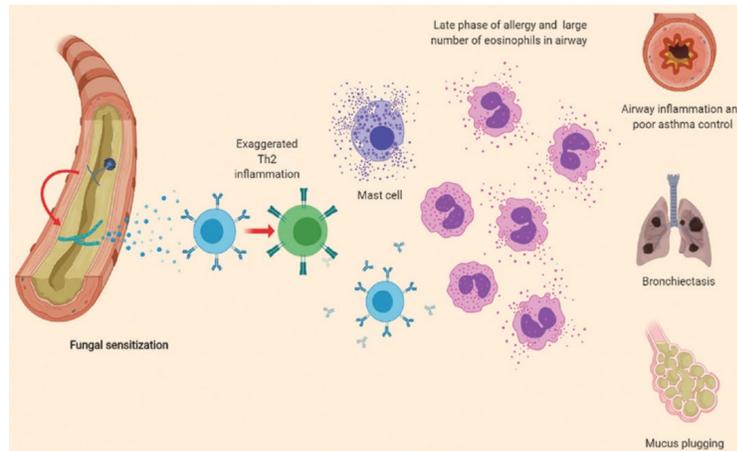


Figura 8. Fisiopatogenia. Las hifas en un paciente susceptible causan una respuesta exagerada inmunológica mediada por Th2, promoviendo mayor inflamación. Esta fase es caracterizada por reclutamiento de mastocitos y aumento en la producción de IgE (total y específica). Las quimiocinas y citocinas secretadas atraen un gran número de eosinófilos atacando y causando mayor inflamación, finalmente causando daño y manifestaciones clínicas. (Flecha roja indica el paso donde la predisposición genética juega un rol clave) (47).

1.7 GENERALIDADES ALÉRGENOS

Los alérgenos son moléculas capaces de inducir la producción de anticuerpos IgE específicos en individuos predispuestos. Estas moléculas resultan inocuas para la mayoría de los individuos y solo aquellos susceptibles responden de forma anormal, desarrollando una reacción alérgica. Algunos factores que pueden influir en la transformación de un antígeno a un alérgeno son la estabilidad, solubilidad, conformación molecular, características bioquímicas, concentración o facilidad para acceder al sistema inmune (48).

La mayor parte de los alérgenos son proteínas solubles y glicoproteínas. Suelen ser, por tanto, cadenas de aminoácidos que se pliegan tomando una conformación

espacial, lo que implica que unas partes de la proteína quedan en situación de mayor accesibilidad para ser reconocidas por el sistema inmune y que frecuentemente son grupos polares hidrofílicos de la cadena de aminoácidos.

Los aeroalérgenos son aquellos alérgenos que, independientemente de su procedencia, son transportados por el aire (48).

Dentro de los aeroalérgenos se encuentran las esporas fúngicas componentes atmosféricos universales en ambientes de interior y exterior, actualmente se reconocen como causas importantes de alergias respiratorias.

Las esporas fúngicas y los extractos de esporas, cuando se administran durante las pruebas de provocación por inhalación, pueden causar broncoconstricción inmediata en sujetos sensibles. Síntomas no respiratorios como alergias alimentarias o urticaria por contacto han sido descritos anecdóticamente. Más de 80 géneros de hongos se han asociado con síntomas de alergia del tracto respiratorio (1).

Estudios aerobiológicos muestran que las esporas de hongos están presentes en la atmósfera en todo el mundo. Se pueden observar múltiples especies en cualquier época del año, pero en climas templados, el número de esporas alcanza su punto máximo durante el verano y el otoño, disminuye con temperaturas más frías y están ausentes donde se produce la capa de nieve. A pesar de la importancia clínica y la liberación abundante de esporas de hongos, relativamente pocas investigaciones se han centrado en la relación entre las esporas en el aire y las enfermedades alérgicas (1).

La mayoría de las partículas inhaladas mayores a 10 μm (la mayoría del polen y algunas esporas más grandes) se depositan en la nasofaringe y se asocian con síntomas nasales y oculares generalmente denominados fiebre del heno. Por el contrario, las partículas menores a 10 μm , especialmente las menores a 5 μm , pueden penetrar en las vías respiratorias inferiores, donde las reacciones alérgicas

tienden a manifestarse como asma. Las esporas fúngicas difieren en tamaño y están asociadas con síntomas respiratorios tanto superiores como inferiores (1).

1.7.1 NOMENCLATURA DE ALÉRGENOS

Actualmente, la identificación de alérgenos se realiza de acuerdo con la normativa de la International Union of Immunological Societies (IUIS). Para cada alérgeno se utilizan las primeras tres letras del género, la primera de ellas en mayúscula, después la primera letra de la especie en minúscula y se acompaña de un número arábigo que indica el orden de la caracterización. (Por ejemplo, Phl p 1 es el primer alérgeno caracterizado de dicha especie). Cuando la clasificación va precedida de la letra n indica una variante natural y si va precedida de letra r, es una variante recombinante. Debido al incremento de los alérgenos caracterizados, se han creado bases de datos con actualizaciones periódicas sobre la información referente a los diversos alérgenos, como www.allergen.org (48).

1.7.2 PROTEÍNAS ALERGÉNICAS

El número de alérgenos fúngicos oficialmente reconocidos por la Organización Mundial de la Salud y la Unión Internacional de Nomenclatura de alérgenos de la Sociedad Inmunológica (OMS/IUIS) es de 84 para el género de Ascomycota y 23 para el género de Basidiomycota, sin embargo, en la literatura se superan los 200 alérgenos (49).

Se han reportado un total de 30 alérgenos para *A. Fumigatus*, 12 para *Alternaria alternata*, 8 alérgenos causantes de patología respiratoria en *Cladosporium herbarum* y 10 en *Malassezia sympodialis*. Dichos alergenos se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1. Alérgenos descritos en OMS/IUIS

ALERGENO	NOMBRE BIOQUÍMICO	PESO	RUTA DE EXPOSICIÓN
<i>Aspergillus fumigatus</i>			
Asp f 1	Familia Mitogilin	18 kDa	Ambiental

Asp f 2		37 kDa	Ambiental
Asp f 3	Proteína peroxisomal	19 kDa	Ambiental
Asp f 4		30 kDa	Ambiental
Asp f 5	Metaloproteasa	40 kDa	Ambiental
Asp f 6	Superóxido dismutasa	26.5 kDa	Ambiental
Asp f 7		12 kDa	Ambiental
Asp f 8	Proteína P2 ribosomal	11 kDa	Ambiental
Asp f 9		34 kDa	Ambiental
Asp f 10	Aspartato proteasa	34 kDa	Ambiental
Asp f 11	Isomerasa peptidil-prolil	24 kDa	Ambiental
Asp f 12	P90	90 kDa	Ambiental
Asp f 13	Serin proteasa alcalina	34 kDa	Ambiental
Asp f 15		16 kDa	Ambiental
Asp f 16		43 kDa	Ambiental
Asp f 17		27 kDa	Ambiental
Asp f 18	Serin proteasa vacuolar	34 kDa	Ambiental
Asp f 19	HSP 80	69.4 kDa	Ambiental
Asp f 22	Enolasa	46 kDa	Ambiental
Asp f 23	L3 ribosomal	44 kDa	Ambiental
Asp f 24	EF 1 B factor de elongación	34 kDa	Ambiental
Asp f 27	Ciclofilina	18 kDa	Ambiental
Asp f 28	Tiorredoxina	13 kDa	Ambiental
Asp f 29	Tiorredoxina	13 kDa	Ambiental
Asp f 34		20 kDa	Ambiental
Asp f 35	Dismutasa superoxida, similar Ole e 5	21 kDa	Ambiental
Asp f 36	Aldolasa	42 kDa	Ambiental
Asp f 37	Deshidrogenasa NAD- dependiente	35 kDa	Ambiental
Asp f 38		25 kDa	Ambiental
Asp f 39	FG- GAP proteína	35 kDa	Ambiental
<i>Alternaria alternata</i>			
Alt a 1		16.4 kDa	Ambiental
Alt a 3	Proteína de calor 70		Ambiental
Alt a 4	Disulfuro isomerasa	57 kDa	
Alt a 5	Proteína P2 ribosomal	11 kDa	Ambiental
Alt a 6	Enolasa	45 kDa	Ambiental
Alt a 7	Proteína YCP4	22 kDa	Ambiental
Alt a 8	Manitol deshidrogenasa	29 kDa	Ambiental
Alt a 10	Aldehído deshidrogenasa	53 kDa	Ambiental
Alt a 12	Proteína P1 ribosomal	11 kDa	Ambiental
Alt a 13	Glutation-S- transferasa	16 kDa	Ambiental
Alt a 14		24 kDa	Ambiental
Alt a 15	Serin proteasa	58 kDa	Ambiental
<i>Candida albicans</i>			
Cand a 1	Alcohol Deshidrogenasa	40 kDa	Ambiental
Cand a 3	Proteína peroxisomal	20 kDa	Ambiental
<i>Cladosporium cladosporioidea</i>			
Cla a 9	Serin proteasa vacuolar	36 kDa	Ambiental

Cla c 14	Transaldolasa	36.5 kDa	Ambiental
<i>Epicoccum purpurascens</i>			
Epi p 1	Serin proteasa	30 kDa	Ambiental
<i>Fusarium culmorum</i>			
Fus p 4	Transaldolasa	37.5 kDa	Ambiental
Fus p 9	Serin proteasa vacuolar	36.5 kDa	Ambiental
<i>Penicillium brevicompactum</i>			
Pen b 13	Serin proteasa alcalina	33 kDa	Ambiental
Pen b 26	Ácido ribosomal prot P1	11 kDa	Ambiental
<i>Penicillium chrysogenum</i>			
Pen ch 13	Serin proteasa alcalina	34 kDa	Ambiental
Pen ch 18	Serin proteasa vacuolar	32 kDa	Ambiental
Pen ch 20	N. acetil- glucosaminasa	68 kDa	
Pen ch 31	Calreticulina		Ambiental
Pen ch 33	Enolasa	16 kDa	Ambiental
Pen ch 35	Transaldolasa	36.5 kDa	Ambiental
<i>Penicillium citrinum</i>			
Pen c 3	Proteína de membrana peroxisomal	18 kDa	Ambiental
Pen c 13	Serin proteasa alcalina	33 kDa	Ambiental
Pen c 19	HSP70	70 kDa	Ambiental
Pen c 22	Enolasa	46 kDa	Ambiental
Pen c 24	Factor beta 1	25 kDa	Ambiental
Pen c 30	Catalasa	97 kDa	
<i>Penicillium crustosum</i>			
Pen cr 26	Fosfoproteina ribosomal 60s	11 kDa	Ambiental
<i>Rhizopus oryzae</i>			
Rhi o 1	Endopeptidasa	44 kDa	Ambiental
Rhi o 2	Ciclofilina	18 kDa	Ambiental

1.8 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de ABPA / MBPA debe sospecharse en pacientes susceptibles que presentan secreciones bronquiales en moldes café, aparición o aumento de sibilancias, infiltrados pulmonares y reducción de la función pulmonar (17).

Para el caso de ABPA/MBPA se han propuesto diversos criterios diagnósticos durante la evolución, dichos criterios se enlistan en (Tabla 2) (17).

Tabla 2. Criterios diagnósticos de múltiples asociaciones y consensos descritos hasta la actualidad.

Criterios diagnósticos clásicos de ABPA según Patterson, Rosemberg	Mayores	Obstrucción bronquial Eosinofilia Test cutáneo positivo para <i>Aspergillus</i>	Deben cumplirse 4 criterios mayores y 1 menor para hacer el diagnóstico de ABPA.
--	---------	---	--

		<p>Precipitinas positivas para <i>Aspergillus</i> IgE total elevada IgE e IgG específicas elevadas Infiltrados pulmonares transitorios bronquiectasias centrales</p>	
	Menores	<p>Presencia de <i>Aspergillus</i> en el esputo mediante cultivo o hifas Esputo café en molde Test cutáneo positivo fase tardía</p>	<p>Modificados por Greenberg: Se añadió: - Disminución de niveles de IgE en 50% y mejoría clínica luego del uso de esteroides.</p>
<p>Criterios diagnósticos clásicos de ABPA en QF en Reino Unido 2002</p>		<p>Obstrucción bronquial Infiltrados pulmonares IgE sérica total >500 UI/ml o incremento en 4 veces IgE específica o test cutáneo para <i>Aspergillus</i> positivo Eosinofilia >500/mm³ Cultivo para <i>Aspergillus</i> positivo o hallazgo de hifas en esputo</p>	
<p>Consenso de la Fundación de FQ para ABPA en USA</p>		<p>Deterioro clínico agudo/subagudo IgE sérica total >1000 UI/ml Test cutáneo positivo para <i>Aspergillus</i> Precipitinas o IgG específica + para <i>Aspergillus</i> Infiltrados intersticiales nuevos o en aumento.</p>	
<p>Criterios ABPA en pacientes sin asma por la ISHAM (2020)</p>		<p>1 Asma 2. IgE específica positiva (> 0.35 KAU/L) o Pruebas cutáneas 3. Ige total > 500 IU/mL y dos de los siguientes: - IgG > 27 mg A/L - Bronquiectasias en TAC - Eosinófilos > 500 cel/ul - Impactación de moco en TAC -</p>	
<p>Criterios ABPA/MBPA por Ascon (2021)</p>		<p>1.Historia de asma o cuadro clínico compatible 2.Eosinofilia (> 500 cel/mm³) 3. IgE elevada (> 417 IU/mL) 4. Pruebas cutáneas positivas 5.Presencia de precipitinas o IgG 6. Cultivo o lavado bronquial positivo a hongo filamentoso 7.Bronquiectasias en TAC 8. Presencia de tapones de moco en bronquio central en TAC o broncoscopia con impactación de moco. 9. Impactación de moco en TAC.</p>	<p>Pacientes que cumplan con más de 6 criterios: POSITIVOS.</p>

	10. Presencia de hifas en el tapón de moco bronquial.	
--	---	--

Hallazgos en estudios de imagen

Radiografía de tórax: Infiltrados pulmonares transitorios o persistentes, subpleurales, particularmente en lóbulos superiores y medios (debido a obstrucción bronquial por tapones mucosos que desaparecen o disminuyen luego del tratamiento con esteroides) (17).

TAC de tórax: impactaciones mucosas, nódulos centros lobulares y engrosamiento pleural. En etapas más avanzadas pueden observarse bronquiectasias centrales o proximales varicosas y quísticas, cavitaciones y finalmente fibrosis pulmonar. Las bronquiectasias centrales son características del ABPA (Figura 9) (17).



Figura 9. TAC de tórax (ventana pulmonar) de aspergilosis alérgica pulmonar.

Figura 9. Tomografía computarizada de tórax (ventanas de pulmón) que muestra bronquiectasias en el pulmón izquierdo (flechas). El pulmón derecho muestra bronquios dilatados llenos de moco, que se denominan broncocele (punta de flecha) (50).

Test cutáneo (Prick Test)

Detecta sensibilización al agente micótico, siendo un método rápido y de fácil realización. Respecto a ABPA, la prevalencia de la prueba cutánea positiva para *Aspergillus* es de 23-28% en asmáticos y 29% en pacientes con FQ sin ABPA (17).

Pruebas serológicas.

IgE total: Se eleva en fase aguda, a valores >417 UI/mL o elevación de 2 veces el nivel basal. Sirve como marcador de exacerbaciones y de respuesta al tratamiento (20).

IgE específica: Es un marcador más sensible, tiene alto valor diagnóstico y como marcador de exacerbación o remisión de la enfermedad (17).

Precipitinas

La prueba de precipitinas constituye una prueba serológica en la cual una reacción positiva se manifiesta por precipitación química visible que se produce cuando un antígeno soluble reacciona con su precipitinas, es decir, los anticuerpos que pueden formar un precipitado.

El método más empleado para la demostración de precipitinas en suero es un método de inmunodifusión en fase sólida. Los antígenos empleados en este método suelen ser extractos crudos que se pueden preparar en el laboratorio. Tiene la desventaja de tener baja sensibilidad ya que pueden estar presentes en otras enfermedades respiratorias o pueden estar enmascaradas por la ingesta concomitante de corticosteroides (20).

Histología

En cuanto a las características histológicas, estas varían de pacientes a paciente e incluso en diferentes áreas del pulmón en un mismo paciente. El examen histológico

de ABPA revela la presencia de moco, fibrina, cristales de Charcot-Leyden, espirales de Curschmann y células inflamatorias. Las hifas pueden encontrarse en las cavidades de las bronquiectasias. La pared bronquial usualmente está infiltrada por células inflamatorias, principalmente eosinófilos. Ocasionalmente puede ocurrir crecimiento fúngico en el parénquima pulmonar. La granulomatosis broncocéntrica, la presencia de granulomas no caseificantes conteniendo eosinófilos y células gigantes multinucleadas también pueden presentarse (20).

1.9 TRATAMIENTO

El tratamiento de la MBPA tiene como objetivo controlar los episodios de inflamación aguda y limitar la lesión pulmonar progresiva. La decisión de iniciar esteroide para ABPA/ MBPA es basado en la clínica y hallazgos tomográficos encontrados. Los glucocorticoides sistémicos se consideran el pilar del tratamiento de la ABPA aguda según los resultados de series de casos; no se han realizado ensayos clínicos, en la India (50), se inicia tratamiento con prednisona oral a 0.5 mg/kg/día por 4 semanas, 0.25 mg/kg/día por 4 semanas, 0.125 mg/kg/día por 4 semanas finalmente disminuyendo a 5 mg/día cada dos semanas.

La terapia antimicótica puede ayudar a disminuir las exacerbaciones, sin embargo, no es tratamiento de elección, por lo que puede ayudar en aquellos casos donde exista contraindicación de iniciar glucocorticoides o en aquellos pacientes que cursen con asma controlada. Los glucocorticoides inhalados pueden ayudar a controlar los síntomas del asma, pero no tienen eficacia documentada para prevenir episodios agudos (51).

El tratamiento para exacerbaciones secundarias a ABPA se recomienda uso de glucocorticoides sistémicos en la misma dosis en la primera exacerbación y combinación con itraconazol y glucocorticoide en las exacerbaciones subsecuentes durante 6 meses (21).

Además, las directrices de la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) de 2016 sobre el tratamiento de la aspergilosis recomiendan que el tratamiento de la ABPA aguda o recurrente debe consistir en una combinación de glucocorticoides e itraconazol (51). El voriconazol es una alternativa razonable al itraconazol porque algunos pacientes lo toleran mejor y se absorbe bien.

1.10 COMPLICACIONES

Las complicaciones de ABPA/MBPA incluye exacerbaciones frecuentes, hemoptisis, bronquiectasias, fibrosis pulmonar y cor pulmonale. Sin embargo, el diagnóstico temprano y tratamiento oportuno pueden prevenir bronquiectasias y otras complicaciones (21).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro de las enfermedades respiratorias alérgicas, las ocasionadas por aeroalérgenos de hongos, son las que han creado más dificultad para su abordaje y estudio debido a la gran diversidad y carácter cosmopolita de éstos, además de las diferencias antigénicas que presentan respecto a otros alérgenos.

Una de las enfermedades respiratorias alérgicas más frecuentes de interconsulta en el servicio de Alergología e Inmunología Clínica del INER es la micosis broncopulmonar alérgica (MPBA), la cual es una entidad difícil de diagnosticar debido a la falta de estándares diagnósticos, así como de información existente de dicha enfermedad.

Debido a estas limitaciones, se nos han presentado pacientes quienes cumplen con criterios de la ISHAM para MBPA sin encontrar una sensibilidad específica a hongos, motivo por el cual se lleva a cabo el presente estudio con la finalidad de corroborar la posible sensibilidad a hongos causante de su MBPA.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué hongos de cultivos aislados *in situ* son causa de sensibilidad alérgica en pacientes con sospecha de micosis broncopulmonar alérgica?

3. JUSTIFICACIÓN

Magnitud. La MBPA se presenta tanto en pacientes adultos y pediátricos con asma y/o fibrosis quística (7,20). Actualmente no existe una prevalencia verdadera de MBPA en México, debido a la ausencia de marcadores y algoritmos diagnósticos.

Se estima que existen al menos 300 millones de personas con asma alrededor del mundo, y se presume que exista un aumento a 400 millones para el año 2025. Se han identificado a los hongos como uno de los factores desencadenantes del espectro de enfermedades alérgicas de las vías respiratorias las cuales pueden variar desde asma, rinosinusitis fúngica alérgica, micosis broncopulmonar alérgica, y asma grave con sensibilidad alérgica. De manera habitual los individuos sanos llegan a inhalar alrededor de 1,000 esporas de hongos diariamente, por lo que sí el aclaramiento de estas esporas falla los hongos pueden llegar a crecer e invadir el tejido pulmonar causando micosis invasiva. Asimismo, se requiere de un balance apropiado entre la respuesta inmune de aclaramiento de dichas esporas sin llegar a desarrollar hipersensibilidad (5).

Trascendencia. A nivel mundial la sospecha diagnóstica de aspergilosis y micosis broncopulmonar alérgica promedia alrededor de 10 años de retraso desde la aparición de los primeros síntomas hasta el diagnóstico definitivo, favoreciendo la aparición de complicaciones.

Originalidad. Existen pocos estudios a nivel internacional y nacional sobre la identificación de alérgenos fúngicos asociados a MBPA lo cual es una limitante para diagnosticar dicha enfermedad.

Factibilidad. El INER es una institución de tercer nivel que constituye un centro de referencia para patologías de vías respiratorias de alta complejidad, por lo que es posible contar con la población de pacientes necesarios para la realización del presente estudio, además de contar con los recursos materiales y humanos.

4. OBJETIVOS

Objetivo primario.

Aislamiento e identificación de hongos intradomiciliarios aislados *in situ* en hogares de pacientes con sospecha de micosis broncopulmonar alérgica.

Objetivos secundarios.

- Identificar factores intradomiciliarios que puedan favorecer el crecimiento de hongos causantes de reacciones alérgicas.
- Aislamiento y cultivo de hongos intradomiciliarios asociados a la micosis broncopulmonar alérgica.
- Identificación a nivel de especie de hongos causantes de reacciones de hipersensibilidad en cada paciente.
- Identificación de proteínas de unión a IgE asociados a micosis a broncopulmonar alérgica.

5. HIPÓTESIS

Alérgenos fúngicos de hongos aislados en las viviendas de pacientes con asma y/o fibrosis quística están asociados con el desarrollo de micosis broncopulmonar alérgica.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de la investigación: Departamento de Micología y Alergia e Inmunología clínica del INER.

6.1 DISEÑO DE ESTUDIO

Propósito general: Descriptivo

Forma de asignación de los agentes: Estudio experimental

Secuencia temporal: Transversal

Inicio del estudio con relación a la cronología de los hechos: Prospectivo

6.2 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

- a. Criterios de inclusión:
 - i. Grupo de estudio: Pacientes con diagnóstico de asma de género y edad indistinta por guías GINA, eosinofilia documentada e IgE total > 417 UI/ml, hallazgos radiográficos compatible con MBPA y panel inhalatorio para hongos negativo.
 - ii. Grupo de control: Pacientes sin diagnóstico de Asma
- b. Criterios de Exclusión:
 - i. Pacientes que cuenten únicamente sensibilidad a *Aspergillus* por medio de pruebas cutáneas o perfil de alérgenos inhalatorios, positivo únicamente para *Aspergillus*.
- c. Criterios de Eliminación:
 - i. Pacientes con expediente incompleto.
 - ii. Pacientes que no cuenten con expediente o seguimiento en el instituto nacional de enfermedades respiratorias.
 - iii. Pacientes que no entreguen las muestras solicitadas para el cultivo.
 - iv. Pacientes que deseen abandonar el estudio.
- d. Tamaño de Muestra:

- i. Se definirá por muestreo no probabilístico – muestreo por conveniencia.

6.3 DEFINICIÓN OPERACIONAL DE VARIABLES

Tabla 3. Definición operacional de variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA
EDAD	Tiempo que ha vivido una persona desde su nacimiento.	Años cumplidos de los pacientes al momento de su inclusión en el estudio.	Cuantitativa continua.	Años
SEXO	Características biológicas que distinguen hombre de mujer.	Género al que pertenece el paciente.	Cualitativa dicotómica.	1.- Mujer 2.- Hombre
DIAGNÓSTICO			Cualitativa politómica.	1.- Rinitis alérgica 2.-Asma
MOHO VISIBLE	Recubrimiento veloso o filamentosos producido por diversos tipos de hongos sobre materia orgánica, que provoca su descomposición; forma una capa de color negro, azul, verde o blanco.	Presencia de moho en superficies visibles reportado en cuestionario demográfico.	Cualitativa dicotómica.	1.- Si 2.- No
MATERIAL DE CONSTRUCCIÓN	Materiales utilizados en construcción.	Presencia de material de construcción reportado en cuestionario demográfico.	Cualitativa dicotómica.	1.- Si 2.- No
FUGA DE AGUA	Salida o escape de un agua accidental o inadvertida.	Presencia de fuga de agua conocida en domicilio reportado en cuestionario demográfico.	Cualitativa dicotómica.	1.- Si 2.- No
CORTINAS DE TELA	Pieza de tela o material flexible para cubrir una ventana.	Presencia cortinas de telas reportado en cuestionario demográfico.	Cualitativa dicotómica.	1.- Si 2.- No
VENTANAS	Abertura practicada a cierta altura del suelo en un muro o pared que sirve para proporcionar iluminación y ventilación en el interior de un edificio.	Presencia de ventanas reportado en cuestionario demográfico.	Cualitativa dicotómica.	1.- Si 2.- No
MAYOR TIEMPO DE ESTANCIA	Tiempo de permanencia en un lugar.	Tiempo de estancia intradomiciliario reportado en cuestionario demográfico.	Cuantitativa continua	Horas
DESENCADENANTE	Factor que origina o provoca un suceso.	Exacerbación de síntomas alérgicos que comienza posterior a cierto evento activador o disparador.	Cualitativa dicotómica.	1.- Si 2.- No
PRUEBAS CUTÁNEAS	Prueba diagnóstica utilizada a través de inyección de alérgenos para identificación de sensibilización alérgica.	Pruebas intradérmicas en cara anterior del brazo a una dilución de 1:100 realizadas a los pacientes del estudio.	Cualitativa dicotómica.	1.- Positivo 2.- Negativo
PANEL AEROALÉRGENOS	Prueba diagnóstica que permite la detección de respuesta alérgica específica contra cada alérgeno estudiado.	Panel de 5 alérgenos fúngicos: <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> ,	Cualitativa dicotómica.	1.- Positivo 2.- Negativo

		<i>Alternaria alternata y Cladosporium herbarum.</i>		
IgE TOTAL INICIAL	Inmunoglobulina que actúa como mediador en procesos alérgicos.	Concentración sérica total de IgE al inicio del estudio.	Cuantitativa continua	Escala
IgE SEG	Inmunoglobulina que actúa como mediador en procesos alérgicos.	Concentración sérica de IgE.	Cuantitativa continua	Escala
PRECIPITINAS IgE	Anticuerpos IgE precipitantes que pueden demostrarse en suero de pacientes con hipersensibilidad.	Presencia de precipitinas IgE en suero de los pacientes del estudio.	Cualitativa dicotómica.	1.- Positivo 2.- Negativo

6.4 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Debido a que el estudio será un estudio observacional, a que NO se alterarán regímenes, posologías, tratamiento concomitante, ni variables ajenas al estudio, consideramos se trata de una investigación con riesgo mínimo.

No se condicionó a los pacientes con el seguimiento clínico ni en el laboratorio por la participación en este proyecto.

No hay beneficios para el sujeto de investigación.

Los pacientes sujetos de investigación se verán exentos de cualquier costo extra a lo que su patología de base requiera.

Este protocolo se llevó a cabo de acuerdo con la última versión de la declaración de Helsinki, las buenas prácticas clínicas y con los requisitos legales locales (57).

- Se sometió el protocolo al comité ético del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias que prevé una aprobación escrita antes del inicio del protocolo.
- Previo a incluir a los pacientes en el protocolo, se dio acuerdo de consentimiento informado y libre, posterior a explicar naturaleza de protocolo, riesgos y obligaciones.

6.5 PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

En el servicio de Inmunología y Alergia del INER se identificaron a los pacientes con sospecha de MBPA que fueron candidatos elegibles para el presente protocolo. Se explicó la naturaleza de este y se dio a firmar consentimiento informado para participar. A los pacientes que aceptaron participar, se obtuvo su información clínica del expediente electrónico y se les dio un cuestionario para obtener los datos demográficos de interés para el protocolo (Anexo 1). Con dichos resultados se analizaron las características demográficas y se establecieron sitios de muestreo de la vivienda basados en mayor tiempo de estancia o sitios con presencia con humedad visible.

6.5.1 Toma de muestra

Se recolectaron en total 3 muestras de suero en la clínica de alergia e inmunología a las que se permitió la coagulación en un lapso de 15-30 minutos a temperatura ambiente (18-22°C). Posteriormente se centrifugaron a 1,600 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, con la finalidad de reducir la contaminación con plaquetas. Se recuperó el sobrenadante correspondiente al suero, se depositó en tubos separadores de suero sin aditivos. Se usaron alícuotas de pacientes con pruebas cutáneas y/o intradérmica positivas a diferentes hongos, preparadas en un pool de suero y, se almacenaron a -80 °C para su posterior uso en la inmunodetección mediante Western-blot.

6.5.2 Panel inhalatorio

Estudio *in vitro* de anticuerpos IgE humanos contra alérgenos inhalatorios más frecuentes en plasma. El panel realizado en el INER es mediante detección IgE EUROIMMUN, mediante EUROBlotMaster que se encarga de procesar tiras de inmunoblots. Dicho perfil incluye la medición de los siguientes hongos: *Penicillium chrysogenum*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata* y *Cladosporium herbarum*.

6.5.3 Muestreo pasivo en placas de Petri

Se colocaron placas de Petri con medios de cultivo a base de agar Sabouraud dextrosa y agar papa dextrosa en los domicilios de los pacientes con la finalidad de aislar hongos ambientales intradomiciliarios a los que están expuestos los pacientes. Dichas cajas se abrieron durante 30 minutos y se colocaron a 1.5 metros del suelo. La colocación se definió según las características encontradas en el cuestionario demográfico y posteriormente se incubaron por 10 días a temperatura ambiente.

6.5.4 Pruebas cutáneas

Previo a explicar al paciente y obtener su consentimiento informado, se realizó asepsia de la cara anterior del antebrazo y se realizó una línea en la piel transversal con 3 cm de separación entre cada línea. Posteriormente se procedió a hacer una punción con una lanceta estéril en los extremos de las líneas y colocar 8 alérgenos fúngicos (*Penicillium notatum*, *Mucor racemosus*, *Aspergillus fumigatus*, *Hormodendrum* sp., *Helminthosporium* sp., *Alternaria* sp., *Rhizopus stolonifer*, *Candida albicans*). Como control negativo se utilizó solución fisiológica al 0.9% y como control positivo clorhidrato de histamina (1:1000). Se midieron los diámetros de la roncha 20 minutos después de la aplicación con una regla graduada en milímetros. Se considera una prueba positiva aquella que tenga un valor mayor a 3 mm en relación con la roncha del control negativo.

6.5.5 Pruebas intradérmicas

Previo a explicar al paciente y obtener el consentimiento informado, se realizaron pruebas intradérmicas en cara anterior del brazo a una dilución de 1:100 (4.95 ml de solución salina 0.9% y 0.05 de alérgeno). Como control negativo se utilizará solución fisiológica 0.9% y como control positivo clorhidrato de histamina (1:1000). Los diámetros de la roncha se midieron 20 minutos después de la aplicación con regla graduada en milímetros. Se consideró prueba positiva cuando la roncha o el eritema fue > 0.3 mm.

6.5.6 Identificación microscópica

Se observó la morfología de cada cultivo aislado de manera individual, adhiriendo sobre la colonia con una cinta adhesiva transparente, una porción del micelio, posteriormente se colocó una gota de azul de algodón sobre un portaobjetos y se pegó un extremo de la cinta adhesiva cargada con el micelio en el extremo del portaobjetos. A continuación, se observó por medio de microscopio binocular con los objetivos 10x y 40x.

6.5.7 Extracción y caracterización de los antígenos fúngicos

Se obtuvieron los antígenos de cada colonia aislada por medio de la técnica de Inmunodifusión de Ouchterlony (58). En medio de cultivo líquido YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2% y agua), se inocularon el micelio y se incubaron durante 15 días a temperatura ambiente. Al concluir los 15 días, los medios de cultivo se filtraron con la finalidad de separar los antígenos del micelio a través de un equipo Millipore utilizando filtros de membrana de 45 mm al vacío.

Posteriormente los micelios obtenidos en los filtros se utilizaron para la extracción de DNA y los sobrenadantes se emplearon para la extracción de proteínas y pruebas serológicas de precipitinas.

Para realizar la serología (precipitinas) se utilizó el antígeno concentrado y 3 diluciones: 1:2, 1:4 y 1:8. Se utilizaron tubos capilares para laboratorio introduciendo 20 μ L del antígeno y 20 μ L del suero del paciente. Como control negativo se utilizó 20 μ L de solución salina 0.9% y 20 μ L del suero del paciente. Se realizó la lectura, midiendo la aglutinación de la muestra 72 horas después (Figura 10).

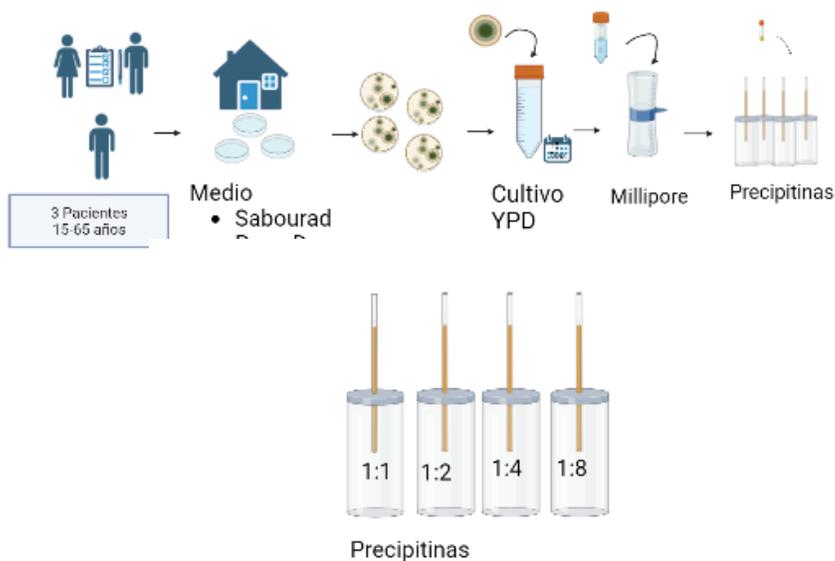


Figura 10. Diagrama de flujo realizado para la obtención del antígeno y diluciones para la prueba de precipitinas.

6.5.8 Extracción de proteínas fúngicas

Se dejaron incubar los cultivos individuales en medio líquido YPD por 15 días y se realizó la extracción de proteínas a partir de las siguientes técnicas:

- a) Al antígeno obtenido a partir de los cultivos en medio líquidos YPD, se añadieron 4 volúmenes de acetona fría a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo durante toda la noche en refrigeración ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) para precipitar las proteínas. Posteriormente se centrifugó $6000 \times g$ en frío durante 30 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 2 mL de solución de lavado (20% ácido tricloroacético en acetona fría $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y DTT al 0.2%) y se realizaron lavados en 4 ocasiones. Se decantó y el pellet resultante se dejó secar al aire a temperatura ambiente. Posteriormente se rehidrató con 200 μL de la solución compuesta por urea 7 M y Tiourea 2 M (agentes caotrópicos-optimiza el efecto disolvente), CHAPS 2% (detergente dipolar que mejora la solubilidad proteica con mínimo efecto disruptivo en 2-DE),

e inhibidores de proteasa (inhibición de enzimas para la preservación proteica). Las muestras se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. En la **Figura 11** se representa un diagrama de flujo explicando el procedimiento de extracción de proteínas.

- b) Se trituró el micelio en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener polvo fino. El polvo fino fue transferido a 20 mL de acetona fría ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se dejó incubar por 1 hora a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, revolviendo de manera ocasional. Se centrifugó la solución a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos a $35,000\text{ x g}$ en cada paso de lavado, se retiró el sobrenadante y el pellet resultante se transfirió a un refractario de cerámica cubierto con papel de parafilm perforado y se dejó secar. Al pellet seco se agregó 0.5 mL de la solución 2-D (8 M urea, 2% CHAPS, 20 mM DTT, 0.002% azul de bromofenol, 0.5 anfolitos pH 3-10) y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y posterior se centrifugó la solución a temperatura ambiente por 15 minutos a $16,000\text{ x g}$, el sobrenadante se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Figura 11. Diagrama de flujo de la extracción de proteínas.

6.5.9 Cuantificación de proteínas

Posterior a la extracción de proteínas, se realizó la cuantificación de éstas con base en las instrucciones del kit 2-D Quant de Cytiva (Cat. 80648356). A 5 μ L de muestra se adicionaron 100 μ L de la solución precipitante y se mezcló con vórtex por 15 segundos a temperatura ambiente, se centrifugó a $> 10,000 \times g$ por 5 minutos y al finalizar se decantó el sobrenadante con pipeta rápidamente, siempre cuidando que la cuña se mantuviera hacia arriba. Se agregaron 20 μ L de solución de cobre, 80 μ L de agua desionizada y 1 mL de agente de color (preparado con 100 partes de solución A y 1 parte de solución B). Se mezcló por inversión y se dejó incubar por 10-15 minutos a temperatura ambiente, al finalizar la incubación se midió la absorbancia a 480 nm en el lector de microplacas iMark de Bio-Rad.

6.5.10 Extracción de DNA

Se realizó por medio del kit de purificación de DNA Wizard genomic de Promega siguiendo las instrucciones del manual A1125. Se agregó micelio del hongo a 200 μ L de H₂O y 50 mg de perlas para triturar, se homogenizó por medio de FastPrep - 24 5G durante 40 segundos por 4 ocasiones. Después se agregó 600 μ L de la solución de lisis y se incubó a 65 °C por 24 horas. Posteriormente se agregaron 200 μ L de la solución de precipitación de proteínas, se mezcló y centrifugó a 13,000 rpm por 3 minutos, para posteriormente retirar el sobrenadante. Se agregó 600 μ L de isopropanol y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto, se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Al secarse se agregó 600 μ L de etanol al 70% y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto, se retiró el sobrenadante y se dejó secar por 15 minutos, agregando 30 μ L de rehidratante de DNA por 1 hora. Posteriormente se cuantificó la cantidad en ng/mL y verificó en un gel de agarosa al 1.5%, documentándose en un equipo ChemiDoc MP Imaging System de Bio-Rad. En la Figura 12 se muestra el diagrama de flujo de la metodología para la extracción de DNA.

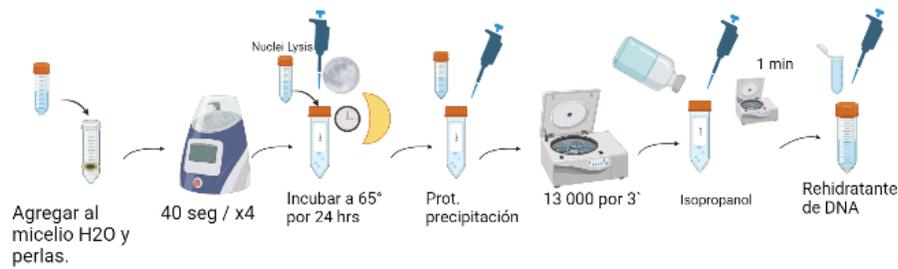


Figura 12. Diagrama de flujo del proceso de extracción de DNA a partir del micelio.

6.5.11 Amplificación de regiones ITS para la identificación de hongos

Se realizó la amplificación de las regiones internas transcritas (ITS) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los productos de PCR se purificaron por medio del kit de extracción rápida PureLink de Thermofisher con base en las instrucciones del catálogo número K2100-12 / K2100-25. Se cortó con bisturí el gel de agarosa y se agregó a un tubo eppendorf con Buffer L3. Se dejó incubar a 50 °C por 10 minutos y se agitó sutilmente para disolver el gel. Disuelto se precipitó con 250 µL de isopropanol y se centrifugó por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y el DNA precipitado se agregó a una columna y se centrifugó a > 6,000 x g por 1 minuto, se lavó la columna con solución de lavado (etanol), se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos y se retiró el sobrenadante (etanol). Se agregó Buffer Elite (E5) y se dejó incubar por 1 minuto a temperatura ambiente. Se centrifugó a > 12,000 x g por 1 minuto y se conservó a -20 °C para ser enviado a secuenciar.

6.5.12 Electroforesis SDS- PAGE

Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 13% en condiciones desnaturalizadas en una cámara Mini – Protean Tetra Cell de Bio-Rad. Para el perfil electroforético de una dimensión se cargaron 20 µg de proteína de cada muestra. Se . Posteriormente los geles se tiñeron con azul de Coomassie por 14 horas. Los geles se lavaron con agua desionizada y después con una solución de desteñido (30% metanol, 10% ácido acético). Finalmente, el gel se documentó en un equipo ChemiDoc MP Imaging System de Bio-Rad.

6.5.13 Western Blot 1-D

Las proteínas separadas por medio de SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de PVDF utilizando la cámara Semi-Dry Transfer cell de Bio-Rad. Para esto se cortó la membrana y dos filtros de acuerdo con las dimensiones del gel preparativo. Primero se activó la membrana PVDF con metanol al 100% por 2-5 minutos; tras su activación, colocamos la membrana y el gel de manera separada en buffer de transferencia por al menos 5 minutos en agitación. Pasado el tiempo se armó un sándwich en el siguiente orden: filtro – membrana – gel preparativo – filtro. Se colocó en la cámara y se corrió por 60 min a 15 V constantes.

Posteriormente, se colocó la membrana en PBS para lavarla por 5 a 10 minutos y remover el exceso de buffer de transferencia. Después, la membrana se bloqueó con 30 mL de la solución EveryBlot Blocking Buffer de Bio-Rad por 30 a 60 minutos a temperatura ambiente con agitación.

Usando el suero de los pacientes como anticuerpo primario a una dilución de 1:25 en EveryBlot Blocking Buffer, la membrana se incubó en agitación a 4°C toda la noche.

Transcurrido el tiempo, la membrana se lavó seis veces con PBS-Tween al 0.05% y una vez con PBS. Posteriormente, se incubó una hora a temperatura ambiente

con el anticuerpo secundario anti-IgE conjugado con peroxidasa de rábano (HRP numero de catálogo 31490 de Thermo Scientific) a una dilución de 1:1000. Después se lavó la membrana en 3 ocasiones con TBS- Tween por 5 minutos.

Finalmente, la membrana se colocó entre dos micas de acetato para su revelado con el kit western- Ready substrate Premium a un tiempo automático de exposición en el equipo ChemiDoc MP Imaging System de Bio-Rad.

8. RESULTADOS

RECLUTAMIENTO DE PACIENTES

Desde el 01 de enero del 2021 hasta el 31 de diciembre del 2022 se realizaron 29 interconsultas al Departamento de Alergología e Inmunología Clínica por sospecha de pacientes con aspergilosis /micosis broncopulmonar alérgica. 12 pacientes cumplieron los criterios de la ISHAM, 7 pacientes se descartaron debido a que contaban con identificación por medio de IgE específica a otras especies. De los 5 restantes, 2 pacientes fueron eliminados por falta de apego a protocolo y entrega de evidencia.

El total de pacientes reclutados fue de 3, el rango de edad fue entre 15 y 65 años, con una edad promedio de 33.6 años, de los cuales 2 fueron de sexo masculino y 1 femenino. Los 3 presentaban como enfermedad concomitante rinitis alérgica. Al realizar las pruebas cutáneas y la toma de suero ninguno de los pacientes se encontraba bajo tratamiento farmacológico (antihistamínico, esteroide sistémico o inmunoterapia).

Los 3 pacientes se reportaron como originarios de la Ciudad de México y en todos los casos el material de construcción de sus hogares correspondió a cemento. En el 100% de los pacientes se documentó presencia de moho visible y en el 66.6% se reportó presencia de goteo o fugas de agua. Los 3 pacientes reportaron contar con ventilación por medio de ventanas, 2.3 en promedio por departamento. En ninguno

de los casos se reportó presencia de alfombras en el domicilio, ni presencia de mascotas, ni de aire acondicionado (Tabla 4 y 5).

Tabla 4. Características demográficas de los pacientes seleccionados en el estudio.

PACIENTE	EDAD	SEXO	ORIGINARIOS	MATERIALES	HABITACIONES	MOHO VISIBLE	FUGAS DE AGUA O GOTERAS	MASCOTAS
1	65	M	Coyoacán, CDMX	Cemento	2	Si (Sala)	Sala	No
2	15	F	Iztapalapa, CDMX	Cemento	3	Si (Planta Baja)	No	No
3	21	M	Tlalpan, CDMX.	Cemento	3	Si (Sala)	No	No

Tabla 5. Características intradomiciliarias de los pacientes seleccionados en el estudio.

PACIENTE	ALFOMBRAS	CORTINAS DE TELA	VENTANAS	MAYOR TIEMPO DE ESTANCIA	DESENCADENANTE
1	NO	SI	2 (Sala)	Intradomiciliario (Sala)	Aumento en sala.
2	NO	NO	3 (Planta alta y 2 planta baja)	Intradomiciliario (Cuarto)	Al entrar a la vivienda (prurito ocular).
3	NO	SI	2 (Sala y recámara)	Intradomiciliario (Cuarto)	Negado.

A los pacientes se les realizaron pruebas cutáneas y/o intradérmicas con un panel de 8 alérgenos fúngicos. En los 3 pacientes se obtuvieron pruebas cutáneas y/o intradérmicas positivas. El paciente 1 fue positivo a los géneros: *Penicillium*, *Mucor* y *Aspergillus*; el paciente 2 a *Hormodendrum* y *Penicillium*; y el tercer paciente a *Fusarium*, *Rhizopus*, *Candida*, *Mucor* y *Helminthosporium*. El panel de aeroalérgenos de hongos fue negativo en los 3 pacientes (Tabla 6).

Para los 3 pacientes se realizaron precipitinas con el pool de hongos (aspergilina, coccidioidina, histoplasmina) establecido en el departamento de investigación de micología. El resultado arrojó positividad en los 3 casos de la siguiente manera: 2 pacientes positivos a una concentración 1:8 para aspergilina, histoplasmina y coccidioidina; y 1 paciente positivo para histoplasmina y coccidioidina a la misma dilución (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados de pruebas cutáneas y/o intradérmicas, IgE total y serología.

PACIENTE	DIAGNOSTICO	PRUEBAS CUTÁNEAS	PANEL AEROALÉRGENOS (HONGOS)	IGE TOTAL INICIAL	PRECIPITINAS
1	Asma	POSITIVAS (<i>Penicillium</i> , <i>Mucor</i> , <i>Aspergillus</i>)	Negativo	3,395 UI/mL	Aspergilina Coccidioidina
2	Asma	POSITIVAS (<i>Hormodendrum</i> , <i>Penicillium</i>)	Negativo	2,298 UI/mL	Aspergilina Histoplasmina Coccidioidina
3	Asma	POSITIVAS (<i>Fusarium</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Candida</i> , <i>Mucor</i> , <i>Helminthosporium</i>)	Negativo	3,395 UI/mL	Aspergilina Histoplasmina Coccidioidina

PACIENTE 1 (S1)

Paciente masculino de 65 años de edad, originario de la Ciudad de México, actual residente de Coyoacán cuenta con diagnóstico de asma y rinitis alérgica. Debido al resultado del cuestionario para conocer sus características demográficas, se colocaron 6 placas de Petri (3 agar papa dextrosa y 3 agar dextrosa Sabouraud) distribuidas 4 en la sala y 2 en la recámara. (Anexo 2)

Posterior a los 10 días de incubación se observaron 20 colonias diferentes macroscópicamente, las cuales fueron aisladas individualmente. El 75% fueron obtenidas de las placas colocadas en la sala (n=15) y el 25% restante en la recámara (n= 5). La exploración microscópica (*Anexo 2*) sugiere que las colonias pertenecen a los siguientes géneros: *Rhizopus* spp., en el 45%, a *Penicillium* spp., en el 20%, *Cladosporium* spp. en el 5%, *Fusarium* spp. en el 5%, y en el 25% no fue posible identificarlo (Figura 13).

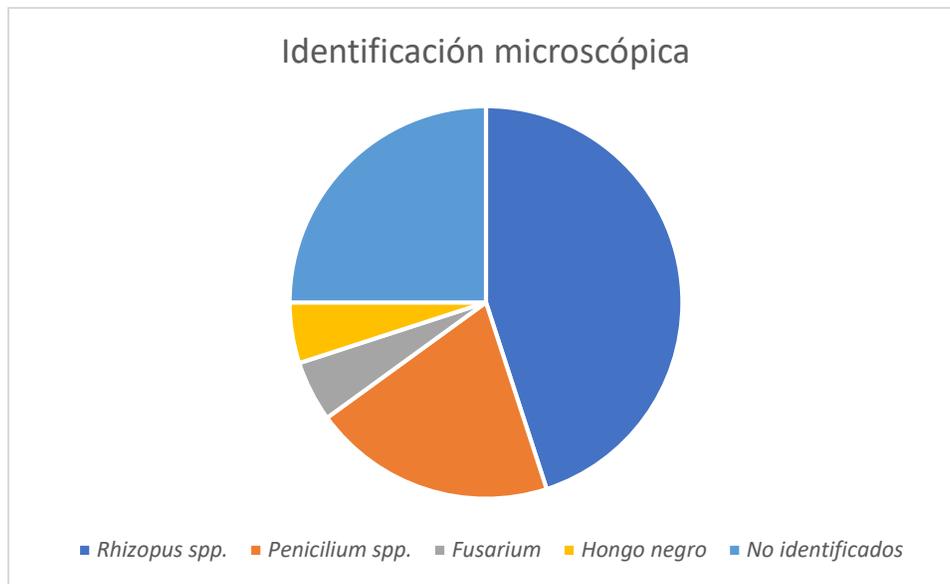


Figura 13. Porcentajes de aislados identificados microscópicamente del paciente S1.

De las precipitinas realizadas a partir de los cultivos individuales, 9 muestras resultaron positivas. (Tabla 7).

Aislado	Dilución				Aislado	Dilución			
	Con	1:2	1:4	1:8		Con	1:2	1:4	1:8
30	-	-	-	-	40	+	-	-	-
31	-	-	-	-	41	-	-	-	-
32	-	-	-	-	42	+	+	-	-
33	-	-	-	-	43	+	-	-	-
34	+	-	-	-	44	-	-	-	-
35	-	-	-	-	45	+	-	-	-
36	-	-	-	-	46	+	-	-	-
37	+	+	+	-	47	+	+	+	-
38	-	-	-	-	48	+	+	+	+

39	-	-	-	-	49	+	+	+	+
----	---	---	---	---	----	---	---	---	---

Tabla 7. Resultados de precipitinas aislados de la muestra S1. (Con: concentrado)

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Se realizó la cuantificación de proteínas por medio de 2-D Quant kit de las 9 muestras positivas en la prueba de precipitinas. Se obtuvieron concentraciones entre 0.09 a 2.21 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 3 de ellas con rangos mayores a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados de cuantificación de extracción de proteínas de S1.

Muestra	Concentración
37	-
47	-
40	0.09 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
43	0.09 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
49	0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
34	0.37 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
48	1.23 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
46	1.28 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
42	2.21 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Extracción de DNA

Posterior a la extracción de DNA con técnica explicada en metodología, se cuantificó y se corrió en un gel de agarosa con la finalidad de verificar la calidad de éste. Dichos resultados se ilustran en la Figura 14.

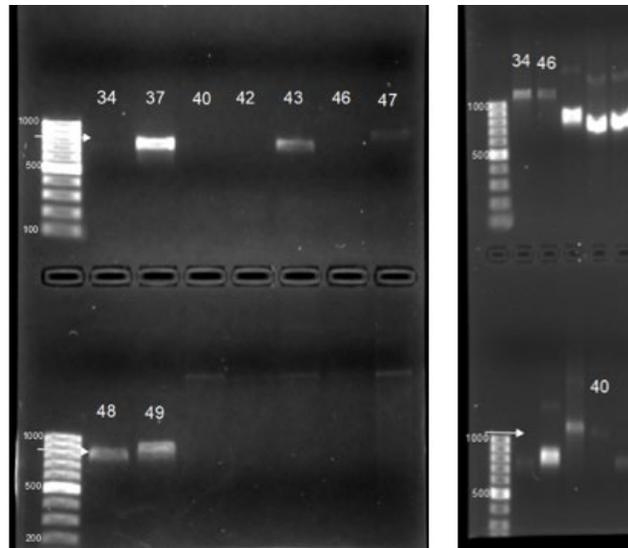


Figura 14 Producto de PCR a partir de DNA extraído de colonias aisladas positivas a la pruebas de precipitinas.

Nueve muestras fueron procesadas para obtener secuencia de nucleótidos. Sin embargo, únicamente en ocho muestras de aislados se lograron amplificar correctamente los genes de interés. Los productos de PCR de ITS ribosomal fúngico se obtuvieron con un peso molecular entre 800 -- >1,000 pares de bases con las cuales pudimos identificar *Rhizopus stolonifer* (34 y 46), *Phlebia subserialis* (47 y 49), *Epicoccum nigrum* (37), *Fusarium nygamai* (43) y *Penicillium crustosum* (48). En la figura 15 se muestra el análisis y alineamiento de las secuencias.

```

* >34 Rhizopus stolonifer 98.88%
* CTCCCTTTTGTTAGTAACTCTATAAAATTTACTTGGTATTATAACGAATATGCAAGAAGGGAGAGAACAAGATAATGAACCTTTTTTAAATAAAATCTTTTCATTTTCAATCAATGATCTGAAGTC
AAG
* >37 Epicoccum nigrum 99.82%
* CCGTAGGTGAACCTGGGGAAGGATCATTACCTAGAGTTTGTAGACTTCGGTCTGCTACTCTTACCCATGTCTTTGAGTACCTGGTTCCTCGCGGGTCCGCCCGCGATTGGACAACATCAAACCTTTGGAG
TTGCAATCAGCGCTGAAAAAACAATAAGTTTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAAGCGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGAATTCAGAAATCAGTGAATCATGAACTCTTG
AACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCAATTTGTACCTCAAGCTCTGGTGGTGGGGTGGTCTCGCTCCCGGTGAGACTCGCTTAAACAATGGCAGCGCCGGCGT
ATTGATTCGGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTGCACCTAAACGACGACGTCCAAAAGTACATTTTACACTCTTCACTGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATCAATAAGCGGA
%
* CCGTAGGTGAACCTGGGGAAGGATCATTACCGAGTTTGAATGGGTTGTAGCTGGCTTACGAAGGATGTGCACACCTGCTCATCCACTCTCATACCCCTGTGCACTATTGTAGACTGGTGGAAAGACTG
GTATCACAAACAGTAGGAAAGGCTTGCCATGTTTAAACAACAGCTCAGTTTGAAGTGCATCTTTGGCTCAACGATGAATATAACTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCA
GCGAAATGGGATAGTAAATGGATTTGCGAATTCAGTAATCAGTGAATCTTGAAGCGACTTGGACTCTTGGATTTCCGAGGAGTATGCTGTTTGGAGTCAATGGATATCTCAACTCTAAAGCTTTGGGA
TAGAGGTTGGATGGAGGTTGTTGGCGCAAGTCAACTCTCTGAATGCAATAGTGAATCTACGGATCGCTCCAGGTGTGATAAAGATCTACGCTGTGGGGTGGAGGATATAGGACTCATGCTT
CTAATCGTCTCTCATGAGACAA
* >48 Penicillium crustosum 95.59%
* CGTAGGTGAACCTGGGGAAGGATCATTACCGAGTTTGAATGGGTTGTAGCTGGCTTACGAAGGATGTGCACACCTGCTCATCCACTCTCATACCCCTGTGCACTATTGTAGACTGGTGGAAAGACTG
GAAGACACCTCGAACTGTCTGAAGTGAAGTCTGAGTGAATAATAATTTTTAAACTTCACACGATCTCTTGGTCCGCAATGATGAAGAACGCAAGCAATGGCATCGTAAATGGAAATGGCAAA
TTCAAGTGAATCATGAGCTTTGAACGACATGCGCCCTGGTATTCCGGGGGCGATGCTGCTCGAGCGTCAATGCTGCTCAAGCCCGCTTGGTGGGGCCCCGCCCCGATCCCGGGGACGCGC
CCGAAAGGCGAGCGCGCACCGCTCCGGTCTCGAGCGATGGGGCTTGACCCGCTGTACCGCGCGCTTGCATCAACCAATTT
* >49 Phlebia subserialis 99.35%
* TCCCGTAGGTGAACCTGGGGAAGGATCATTACCGAGTTTGAATGGGTTGTAGCTGGCTTACGAAGGATGTGCACACCTGCTCATCCACTCTCATACCCCTGTGCACTATTGTAGACTGGTGGAAAGAC
TGGTGTCAACACAGTGGGAAGGCTTGCT
* >43 Fusarium nyssori 98.49%
* GTAGGTGAACCTGGGGAAGGATCATTACCGAGTTTGAATGGGTTGTAGCTGGCTTACGAAGGATGTGCACACCTGCTCATCCACTCTCATACCCCTGTGCACTATTGTAGACTGGTGGAAAGACTG
TCTATATGAAMTTGAGTAAACCATAAATAAATAAACTTTCAACAACGGATCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAAGCACCACAAATGGATAAGTAAAGTGAATGGCAATTCAGTGAATCATCGAATC
TTTGAACGACATTTGCGCCCGCAGTATCTGGCGGGCATGCTGTTGAGCGCTTTCAACCTCAAGCCGAGCTGGTGGTGGAGCTCGCGAGTCAATCGGTTCCCAAAATGATTGGCGGACGCTCGAGCTT
CTAGCTATATAAAACCTCGTACTGGAACTGCGCGCCACCCGTTAAACCCAACTCTGATGTGAACCTCGTCAAGTATACCCGCTGAATTAACATCATA
* >46 Rhizopus stolonifer 95.18%
* TTCCCTTTTGTTAGTAACTCTATAAAATTTACTTGGTATAGGGAATATGCAAGAAGGGAGAGAACAAGGCTCTCTTTCCCTTTTTTAAATAAAATCTTTTCATTTTCAATCAATGATCAATGATG
CGAAATCAAAGGG
* >47 Phlebia subserialis
98.42%
TTTAAACAACGCTTCAAGTTTGAAGTGCACATTTGGTCTAACGCATGAAATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATGATGAAGAAGCAGCGAAATGCGATAAGTAAATGTAAT
TGCAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACTTGCACCTCTGGTATTCCGAGGAGTATGCTGTTGAGTGTGATGTTCTCAACTCTAAAGCTTTGCGATAGAGCTTTGGATGGAGGCTCGT
TTGGCGCAAGTCAACTCTCTGAATGCAATGATGTTGAGTGAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAAT
CTTGAACATCGGACTCAAAATCAGGATGAGTACCGGCTGACTA

```

Figura 15. Análisis y alineamiento de secuencias de DNA correspondientes a las regiones ITS.

ELECTROFORESIS UNIDIMENSIONAL S3

Con la finalidad de identificar proteínas totales, se seleccionaron muestras con concentración de proteína mayor a 1 µg/µL (aislados: 48, 46, 42) en geles de poliacrilamida al 13% para su separación por peso molecular. Los geles se cargaron con 20 µg de proteína por pocillo. En la figura 16 se expone el gel teñido con Coomassie de S3.

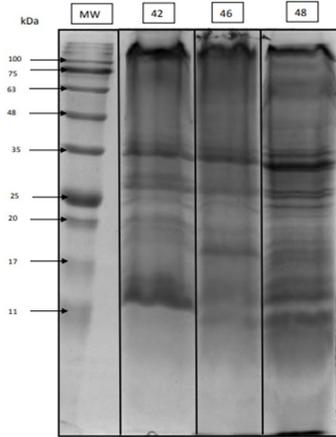


Figura 16. Patrón electroforético de los 3 aislados (42, 46 y 48) de S3 teñidas con azul de Coomassie. MW, marcador de peso molecular en kDa.

Tras la realización de electroforesis se observó un patrón de proteínas enriquecido entre poco más de 100 kDa hasta los 11 kDa en las 3 muestras.

WESTERN BLOT UNIDIMENSIONAL

Con la intención de identificar las proteínas con inmunorreactividad hacia el suero del paciente S3, se procedió a realizar un Western-Blot con las 3 muestras de aislados seleccionadas. En la figura 17 se muestra patrón electroforético de las proteínas inmunorreactivas de los aislados 42,46 y 48.

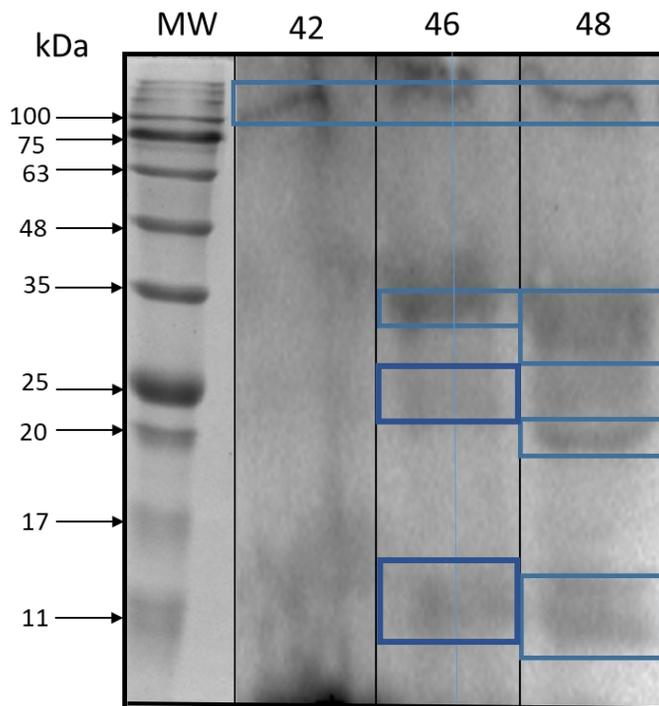


Figura 17. Patrón de proteínas inmunorreactivas detectadas en los aislados 42, 46,48 con suero del paciente S1.

Se obtuvieron bandas de proteínas de unión a IgE en las 3 muestras con un peso alrededor de 100 kDa a hasta 11 kDa.

PACIENTE 2 (S2)

Paciente femenino de 15 años de edad originario de la Ciudad de México, actualmente residente de la delegación Iztapalapa. Cuenta con diagnóstico de asma y rinitis alérgica. Con base al cuestionario se colocaron 6 placas de Petri con ambos medios de cultivo previamente descritos (4 en recámara y 2 en sala). Después de la incubación, se obtuvieron 21 aislados morfológicamente diferentes. El espacio más afectado y diverso fue la recámara con el 76.2 % de las colonias (n= 17) y seguido de la sala con el 23.8% de los aislados (n=5). (Anexo 3)

La identificación microscópica sugiere que los géneros fúngicos identificados en los aislados corresponden a: *Penicillium* spp. 38%, *Alternaria* spp. 14%, *Rhizopus* spp.

14%, *Cladosporium* spp. 4.7% y no identificados en el 29.3. Sin embargo, el género y especie se deberá validar por medio de secuenciación de DNA (Figura 18).

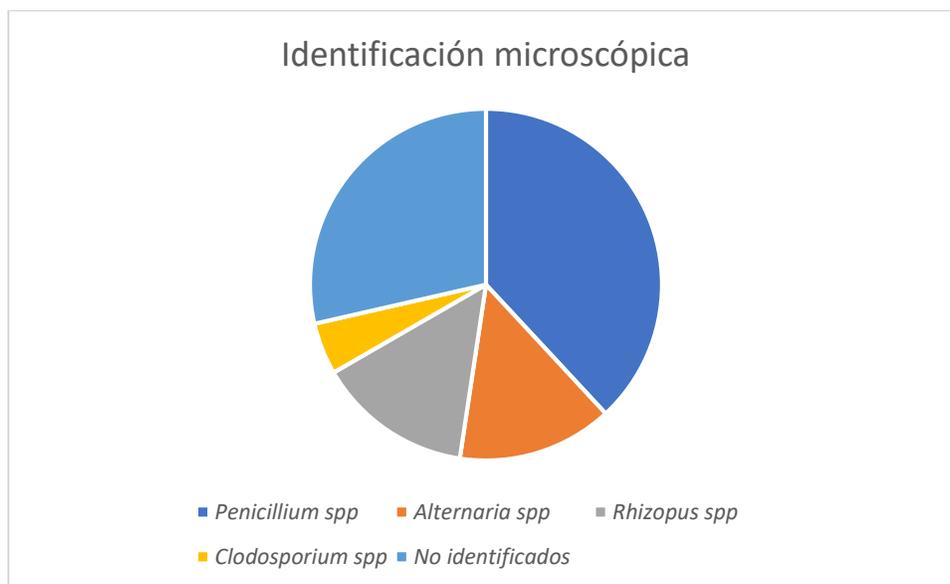


Figura 18. Porcentaje de aislados identificados microscópicamente del paciente S2.

Las precipitinas realizadas resultaron positivas en 18 muestras de los 21 cultivos 33.3% de las muestras positivas a dilución 1:8, 33.3% positivas a dilución 1:6, 22.2% positivas a dilución 1:2 y 11.1 % positivas al concentrado (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados de precipitinas de S2 en las 3 diluciones.

Aislado	Diluciones				Aislado	Diluciones			
	Con.	1:2	1:4	1:8		Con.	1:2	1:4	1:8
50	+	+	+	+	60	+	-	-	-
51	+	+	+	+	61	+	+	-	-
52	+	+	-	-	62	+	+	-	-
53	-	-	-	-	63	+	+	+	-
54	+	+	-	-	64	+	+	+	+

55	+	+	+	+	65	+	+	+	+
56	+	+	+	-	66	+	+	+	+
57	+	+	+	+	67	+	+	+	-
58	+	-	-	-	68	+	+	+	-
59	+	+	+	-	69	+	+	+	-
					70	+	+	-	-

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Posterior a la extracción de proteínas de las 18 muestras positivas en precipitinas se realizó cuantificación de proteínas por medio de 2-D Quant Kit explicado en metodología el cual se realizó por duplicado obteniendo en 12 muestras concentraciones entre 0.59 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 3.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y en 6 muestras con una concentración indetectable (Tabla 10) .

Tabla 10. Resultados de cuantificación de proteínas con método 2-D Quant de S2.

Número de muestra	Concentración	Número de Muestra	Concentración
61	-	56	1.28 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
62	-	57	1.51 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
63	-	59	1.99 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
67	-	64	2.28 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
53	-	50	2.28 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
69	-	55	2.29 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
68	-	51	2.62 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
65	1.09 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	52	3.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
66	1.18 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	54	3.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

PACIENTE 3 (S3)

Paciente masculino de 21 años de edad originario de Ciudad de México y actual residente de la delegación de Tlalpan; con diagnóstico de asma y rinitis alérgica, se realizó cuestionario demográfico y se colocaron placas de Petri en 3 sitios diferentes, obteniendo 29 cultivos morfológicamente diferentes. El espacio más afectado fue el cuarto con el 68.9% de aislados (n= 20), seguido del baño con el 17% de aislados (n= 5) y finalmente la sala con 13.7% (n=4).

En cuanto a la identificación microscópica se sugiere que los géneros fúngicos identificados fueron compatibles con *Aspergillus* y *Fusarium*. Sin embargo, este paciente presentó varios cultivos aislados con presencia de conidios e hifas con estructuras no características a ningún género, por lo que dado a la poca relación clínica se decidió validar información en un segundo intento.

Las precipitinas realizadas en este paciente resultaron positivas en los 29 cultivos aislados en las 4 diluciones implementadas en el Departamento de micología. En la Tabla 11 se enlista el resultado.

Tabla 11. Resultados de precipitinas de paciente S3 en las 3 diluciones implementadas.

Aislado	Diluciones				Aislado	Diluciones			
	1:1	1:2	1:4	1:8		1:1	1:2	1:4	1:8
1	+	+	+	+	15	+	+	+	+
2	+	+	+	+	16	+	+	+	+
3	+	+	+	+	17	+	+	+	+
4	+	+	+	+	18	+	+	+	+
5	+	+	+	+	19	+	+	+	+
6	+	+	+	+	20	+	+	+	+

7	+	+	+	+	21	+	+	+	+
8	+	+	+	+	22	+	+	+	+
9	+	+	+	+	23	+	+	+	+
10	+	+	+	+	24	+	+	+	+
11	+	+	+	+	25	+	+	+	+
12	+	+	+	+	26	+	+	+	+
13	+	+	+	+	27	+	+	+	+
14	+	+	+	+	28	+	+	+	+
					29	+	+	+	+

9. DISCUSIÓN

El presente trabajo constituye un estudio descriptivo cuyo objetivo fue la búsqueda de hongos ambientales intradomiciliarios aislados *in situ* en los domicilios de pacientes con sospecha de micosis broncopulmonar alérgica. Además, a partir de éstos la identificación de proteínas alergénicas asociadas a las reacciones de hipersensibilidad.

En nuestro medio los hongos representan de las principales causas de enfermedad respiratoria alérgica, sin embargo, debido a la limitación de pruebas estandarizadas se han presentado grandes dificultades en el diagnóstico.

A pesar de contar con criterios diagnósticos establecidos para MBPA, no todos los pacientes que cursan con esta patología cumplen todos los criterios, por lo que la ausencia de algunos criterios no descarta la enfermedad. Lo anterior deriva en la necesidad de contar con herramientas de apoyo diagnóstico que permitan optimizar el proceso diagnóstico de los pacientes. Debido a lo anterior se realizó este estudio con el fin de identificar posibles hongos aislados *in situ* causantes de MBPA en nuestro grupo de estudio.

Los pacientes que participaron en este estudio contaban con diagnóstico de asma y rinitis alérgica como enfermedades concomitantes, lo cual se correlaciona con toda la información existente en la literatura en donde se menciona que la MBPA es una enfermedad inflamatoria causada por una respuesta de hipersensibilidad a antígenos micóticos en el árbol traqueobronquial, casi siempre en individuos con factores predisponentes como asma o enfermedad alérgica (18, 7,20).

En nuestro estudio, se documentó que los tres pacientes contaban con presencia de moho visible en paredes de forma intradomiciliaria, goteras y habitaciones sin ventilación, lo cual se ha visto que son factores de riesgo para el crecimiento de hongos (17), ya que los hongos tienen la característica de ser cosmopolitas y crecer

a diferentes temperaturas, principalmente ambientes húmedos, con mucha vegetación (campo) y casas antiguas (7).

Interesantemente, uno de nuestros pacientes reportó que cambiando de habitación disminuyeron el número de exacerbaciones, lo que sugiere que el factor desencadenante era la exposición a un ambiente con alérgenos ambientales. Lo anterior coincide con estudio reportado por Xiaoting Zhou en febrero del 2023, donde se documentó la exacerbación de un paciente con antecedente de dermatitis atópica y asma ante la exposición repetida a antígenos de *A. fumigatus* y *S. commune*, y en el cual cedió la sintomatología al terminar dicha exposición (53).

Respecto a las características epidemiológicas, en nuestro grupo de estudio se encontró una mediana de edad 21 años y media de 33.6 años, lo cual difiere de lo reportado a nivel internacional, donde se ha reportado una mediana de edad de inicio de 57 años (7) y de forma más reciente un rango de 43 +/- 11 años (50). Dicha diferencia puede ser atribuida al número de pacientes incluidos en nuestro trabajo.

En cuanto a la prevalencia de sexo algunas bibliografías reportan el sexo masculino como el más afectado (1.3:1) (27), esto último coincidiendo con nuestros resultados encontrando como el sexo masculino el más afectado 2:1. Sin embargo la Guía Japonesa reporta predominio en sexo femenino en el 57% de los casos reportados (7).

Los principales géneros de hongos causantes de alergia respiratoria en la Ciudad de México son *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Penicillium* (40). En Estados Unidos, la tercera encuesta nacional de salud reporto que aproximadamente el 12.9% de la población presentó sensibilización a *A. alternata*. En la India se han reportado *Aspergillus* en el 63%, seguido por *Penicillium* y *Mucor* en el 23% (7). Mari et al. en Italia informo que el 19.1% de la población tuvo pruebas cutáneas positivas a hongos. El 66,1% correspondía a *Alternaria*, 12.6% para *Aspergillus*, 44.3% para *Candida*, 13.1% para *Cladosporium* y 8,1% para *Penicillium*. Nuestros hallazgos se correlacionan con los géneros previamente reportados ya que en nuestros 3 pacientes encontramos los géneros *Alternaria*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*,

Fusarium, y *Cladosporium*. Sin embargo, por la limitación de pacientes, no es posible establecer una prevalencia real de sensibilización a estos agentes con nuestros resultados.

En cuanto a las pruebas cutáneas logramos observar que nuestros pacientes se encuentran polisensibilizados, siendo positivos a más de dos alérgenos fúngicos lo cual pudiera deberse a una posible reactividad cruzada. En un estudio publicado en 2009 (54) se menciona que la reactividad cruzada identificada en algunas especies como *Penicillium* y *Candida* puede ser posible, siendo esta más frecuente cuando las proteínas tienen una homología mayor a 50%, por lo que dados nuestros resultados consideramos que pueda tratarse de reactividad cruzada, sin embargo, en la actualidad existe poca evidencia de reactividad cruzada entre extractos fúngicos (54).

Las precipitinas con técnica por doble difusión en gel es un método diagnóstico con sensibilidad aproximadamente del 27% (55), por lo que se recomienda uso conjunto de otros métodos para llegar al diagnóstico de ABPA/ MBPA. En nuestro estudio se observó que las precipitinas positivas del paciente S1 correspondían a: *Rhizopus* 44%, *Penicillium* 22%, *Fusarium* 11.1%, *Epicoccum* 11.1% y *Phlebia subserialis* 22%. En cuanto al paciente S2 las precipitinas positivas correspondió a: *Penicillium* 38%, *Rhizopus* 22%, *Alternaria* 11% y *Cladosporium* 5%, relacionándolo con la gran diversidad de especies. Así mismo se observó positividad de los 3 pacientes a diferentes diluciones lo cual no se ha evidenciado que este asociado a la alergenicidad de hongos (55).

En el caso del inmunoblot usando el suero de nuestro primer paciente se encontró un reconocimiento mediado por IgE en las 3 muestras de aislados (42, 46 y 48). Las especies identificados fueron *Penicillium crustosum* (muestra 48) y *Rhizopus stolonifer o nigricans* (muestra 46). En contraste, el aislado 42 no fue posible su identificación, pero sí presentó reactividad mediada por IgE. La primera especie identificada cuenta con 1 alérgeno reportado por la Unión Internacional de Nomenclatura de alérgenos de la Sociedad Inmunológica (OMS/IUIS) de un peso

de 11 kDa (Pen cr 26). Pero en nuestro estudio encontramos múltiples bandas inmunorreactivas en pesos moleculares desde los 11 kDa a >100 kDa. La primera banda corresponde a un peso molecular de 11 kDa la cual podría corresponder a una fosfoproteína ribosomal ácida P1 (Pen cr 26), la segunda banda corresponde a un peso molecular aproximado de 20 – 23 kDa sin encontrar alérgenos reportados por la IUIS hasta el momento. La tercera banda corresponde a un peso molecular de 25 kDa a 35 kDa que podría corresponder a una serina proteasa ya que existen reportados por la IUIS 5 proteínas identificadas de esa familia. Por último, la cuarta banda corresponde a un peso molecular mayor a 100 kDa, por lo que podría tratarse de nuevos alérgenos no identificados o bien podría tratarse de reactividad cruzada la cual se ha reportado como posible entre *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Penicillium* (54).

En cuanto a la muestra de *Rhizopus stolonifer* o *nigricans* no existen alérgenos descritos por la OMS/IUIS. Existe un artículo del 2012 que reportó la identificación de aeroalérgenos de *Rhizopus oryzae* en donde se identificaron 14 proteínas alergénicas con un peso molecular de 15 a 67 kDa (56). En nuestro estudio se logró reconocer la presencia de 4 bandas de unión a proteínas a IgE. La primera banda identificada con peso molecular entre 11 kDa a 17 kDa donde posiblemente corresponda a una ciclofilina con un peso de 17 kDa. La segunda banda con peso molecular entre 20 a 25 kDa sin encontrarse correlación a ninguna proteína por lo que podría tratarse de reactividad cruzada o bien un nuevo alérgeno no identificado, lo cual deberá corroborarse con espectrometría de masas. La tercera banda reconocida con peso molecular entre 30 a 35 kDa que podría relacionarse a una fructosa- bifosfato aldolasa. Y una cuarta banda >100 kDa la cual no se puede correlacionar a ningún aeroalérgeno identificado hasta el momento. Anticipo que identificare nuevos alérgenos fungicos una vez que realice un Western Blot 2D y analisis por espectrometría de masas.

10. CONCLUSIONES

El presente estudio logró confirmar el diagnóstico de micosis broncopulmonar alérgica causada por *Rhizopus stolonifer* y *Penicillium crustosum* en 1 de nuestros pacientes a través de clínica, pruebas cutáneas, precipitinas, secuenciación y estudios de inmunoproteómica.

Dados nuestros resultados y características demográficas de nuestros pacientes, concluimos que es importante buscar siempre posibles desencadenantes y características intradomiciliarias que pueda favorecer el crecimiento de hongos para de esta manera dar medidas de higiene ambientales (ventilación, iluminación, humedad) para disminuir las posibles exacerbaciones secundarias a la inhalación de esporas.

Sería importante validar que no se trate de una reactividad cruzada dado que las pruebas cutáneas fueron positivas para otros alérgenos como *Aspergillus* lo cual podría justificar el por qué nuestros pacientes cuentan con precipitinas y pruebas cutáneas positivas a otros hongos no identificados microscópicamente en el muestreo ambiental, por lo que se deberá completar investigación realizando un Western Blot 2 D y espectrometría de masas de muestras positivas.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos hasta el momento son muy prometedores para continuar la presente investigación con el fin de lograr la identificación de especie y proteínas causantes de MBPA, por lo que se planea buscar un mejor método de extracción de proteína fúngica y de esta manera realizar Western Blot 2D y ejecutar espectrometría de masas, así como incluir un mayor número de pacientes con la finalidad de validar y corroborar diagnóstico.

Es importante, lograr la estandarización de un método diagnóstico para realizar el abordaje de pacientes que se encuentren en zona gris y así poder ofrecer un tratamiento farmacológico y no farmacológico con medidas ambientales.

11. ANEXOS

Anexo 1: Cuestionario aplicado a participantes.

CUESTIONARIO

El siguiente cuestionario tiene como objetivo conocer las características de demográficas de los pacientes que se agregaron al protocolo “Estudio aerobiológico in situ de alérgenos Fúngicos causantes de enfermedades respiratorias alérgicas”.

Datos de contacto

Nombre: _____ Sexo: ____ Edad: _____

Domicilio (calle, numero, colonia, CP): _____

_____ Municipio y Estado: _____

Escolaridad: _____ Ocupación: _____

¿Usted padece de alguna enfermedad crónico-Degenerativa?

¿Dentro de su casa cuenta con zonas visibles de moho? En caso de responder si ¿En dónde?

¿Dentro de su casa cuenta con fugas de agua o goteras?

¿Dentro de su casa cuenta con alfombras?

¿Su casa cuenta con cortinas de tela? En caso de responder si, ¿Cada cuánto tiempo las lavan?

¿Con que materiales está construido su domicilio?

¿Con cuantas habitaciones cuenta su domicilio?

¿Su hogar cuenta con ventilación (Ventanas)? En caso de contestar si ¿Cuántas?

¿En qué sitio de su casa pasa el mayor tiempo de estancia? (Favor de colocar tiempo en horas)

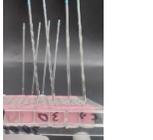
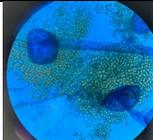
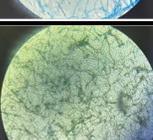
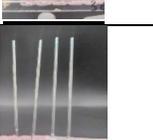
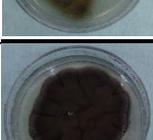
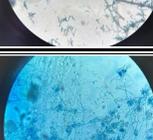
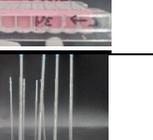
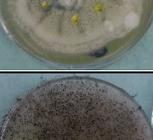
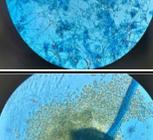
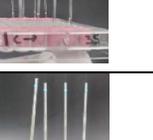
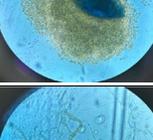
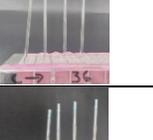
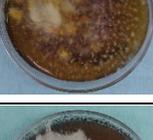
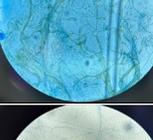
Según la respuesta previamente contestada, ¿Ha notado incremento de síntomas cuando se expone en ese sitio?

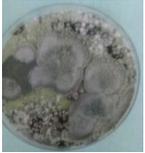
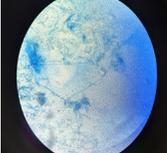
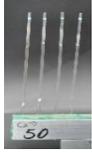
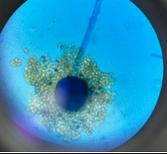
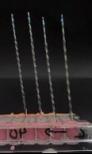
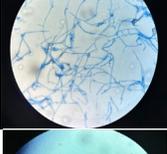
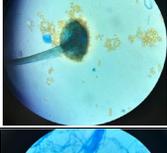
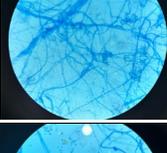
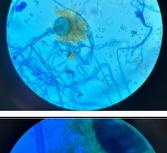
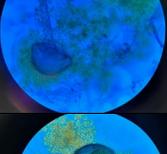
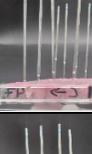
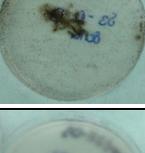
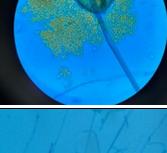
¿La zona donde habita es una zona boscosa o pantanosa?

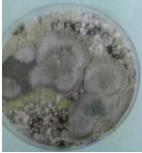
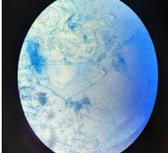
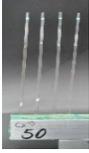
¿La delegación donde usted vive, se encuentra urbanizada?

¿Cuenta con mascotas? En caso de contestar de contestar si, ¿Cuál?

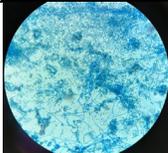
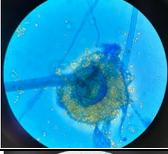
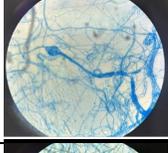
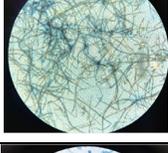
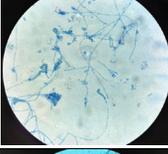
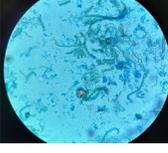
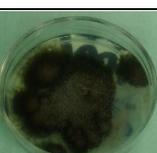
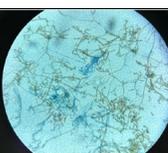
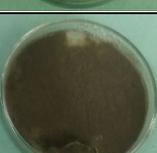
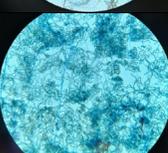
Anexo 2. Imágenes obtenida de los aislados de paciente S1 (macroscópicas, microscópicas) y resultados de precipitinas.

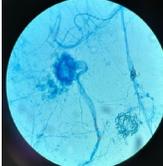
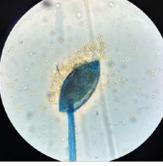
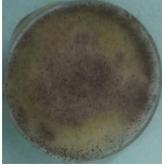
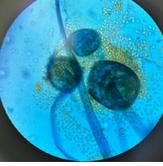
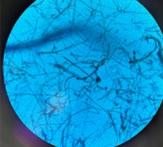
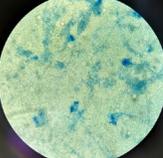
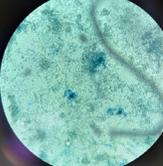
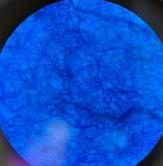
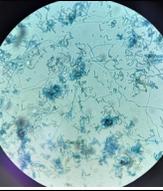
<u>Aislado</u>	<u>Macroscópico</u>	<u>Microscópico</u>	<u>Precipitinas</u>
<u>30</u>			
<u>31</u>			
<u>32</u>			
<u>33</u>			
<u>34</u>			
35			
36			
37			
38			

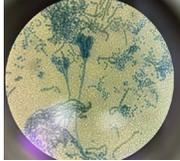
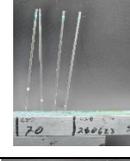
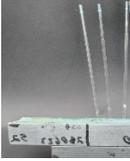
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			

50			
----	---	--	---

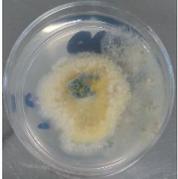
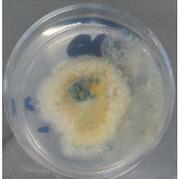
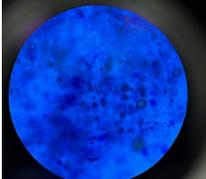
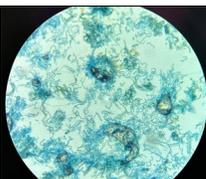
Anexo 3. Imágenes obtenidas de los aislados de paciente S2 (macroscópicas, microscópicas) y resultados de precipitinas.

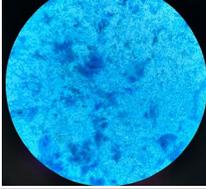
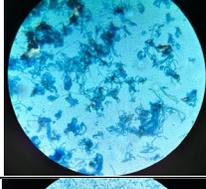
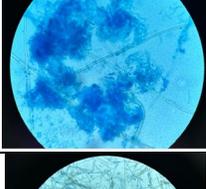
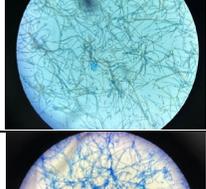
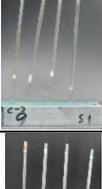
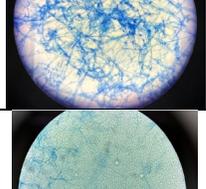
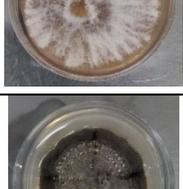
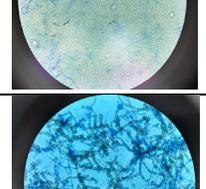
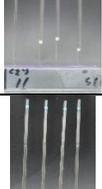
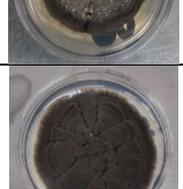
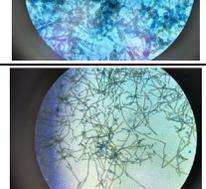
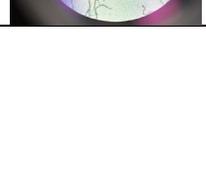
<u>Aislado</u>	<u>Macroscópico</u>	<u>Microscópico</u>	<u>Precipitinas</u>
<u>51</u>			
<u>52</u>			
<u>53</u>			
<u>54</u>			
<u>55</u>			
56			
57			
58			

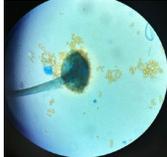
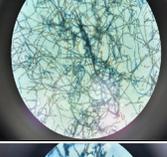
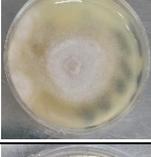
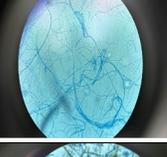
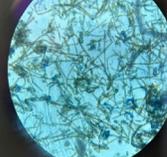
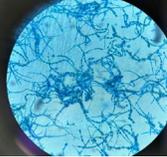
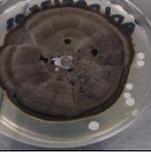
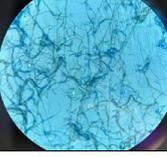
59			
60			
61			
62			
63			
64			
65			
66			
67			

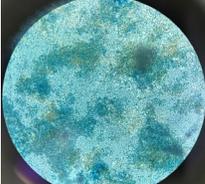
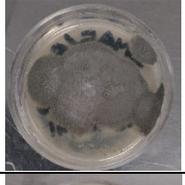
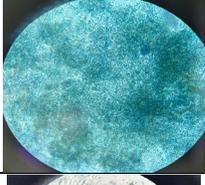
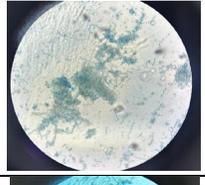
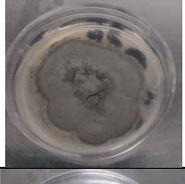
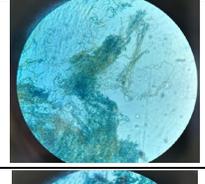
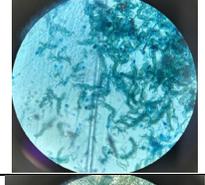
68			
69			
70			

Anexo 4, Imágenes obtenidas de paciente S3 (Imágenes macroscópicas, microscópicas) y resultados de precipitinas.

<u>Aislado</u>	<u>Macroscópico</u>	<u>Microscópico</u>	<u>Precipitinas</u>
<u>1</u>			
<u>1*</u>			
<u>2</u>			
<u>3</u>			
<u>4</u>			

5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			

14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			

24			
25			
26			
27			
28			
29			

12. REFERENCIAS

1. Horner WE, Helbling A, Salvaggio JE, Lehrer SB. Fungal allergens. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8(2):161–79.
2. Moreno A. Los hongos: Héroes y villanos de la prosperidad humano. *Revista digital universitaria* [Internet]. 2016;17(1607–6079):2–10. Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.17/num9/art69/>
3. Vidal VES. *Manual de Micología Básica.* 2021.
4. Montes B, Restrepo A, McEwen JG. Nuevos aspectos sobre la clasificación de los hongos y su posible aplicación médica. *Biomédica.* 2003;23(2):213.
5. Abel-Fernández E, Martínez MJ, Galán T, Pineda F. Going over Fungal Allergy: *Alternaria alternata* and Its Allergens. *Journal of Fungi.* 2023;9(5).
6. González-Díaz SN, Arias-Cruz A, Ibarra-Chávez JA, Elizondo-Villarreal B, Rivero-Arias DM, Salinas-Díaz M del R. Prevalencia de sensibilización a hongos en pacientes con alergia respiratoria. *Rev Alerg Mex.* 2016;63(2):143–53.
7. Okubo K, Kurono Y, Ichimura K, Enomoto T. Japanese guidelines for allergic rhinitis 2020. *Allergology International* [Internet]. 2020;(xxxx). Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.alit.2020.04.001>
8. Terán LM, Haselbarth-Lopez MMM, Quiroz-García DL. Alergia, pólenes y medio ambiente. *Gac Med Mex.* 2009;145(3):215–22.
9. Kauffman HF. Inflammatory cells and airway defense against *Aspergillus Fumigatus*. *Immunol Allergy Clin North Am.* 1998;18(3):619–40.
10. Ruiz Sánchez D. Estudio de hongos ambientales como productores de alergias respiratorias en población pediátrica.pdf. Universidad Nacional Autónoma de México.; 1993.
11. Castagnoli R, Brambilla I, Giovannini M. New approaches in childhood asthma treatment. 2023;0.
12. Baxi SN, Sheehan WJ, Sordillo JE, Mulienberg ML, Rogers CA, Gaf JM, et al. Association between fungal spore exposure in inner-city schools and asthma morbidity. 2019;122.
13. Sharpe RA, Bearman N, Thornton CR, Husk K, Osborne NJ. Indoor fungal diversity and asthma: A meta-analysis and systematic review of risk factors. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [Internet]. 2015;135(1):110–22. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.002>

14. Herrera Barrios O, Paneque Rodríguez I, Rodríguez Canosa JS, Jiménez Martínez M, Otero Heredia L, Rúa Torres N, et al. Sensibilidad cutánea a hongos ambientales y estudio de la microbiota nasal de pacientes con alergias respiratorias. *Investigación Medicoquirúrgica*. 2019;2019(2).
15. Luong AU, Chua A, Alim BM, Olsson P, Javer A. Allergic Fungal Rhinosinusitis : The Role and Expectations of Biologics. *J Allergy Clin Immunol Pract* [Internet]. 2022;10(12):3156–62. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2022.08.021>
16. Knutsen AP. Genetic and respiratory tract risk factors for aspergillosis : ABPA and asthma with fungal sensitization. 2006;(September):61–70.
17. Real Peña EI. Prevalencia y características clínico epidemiológicas de pacientes con aspergilosis broncopulmonar alérgica en la UMAE Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente Año 2011. Universidad Nacional Autónoma de México; 2011.
18. Fitzpatrick ME, Prednergast NT, Rivera-Lebro B. Actualizaciones clínicas en aspergilosis broncopulmonar alérgica (micosis). En: Lange, editor. *Diagnostico Clinico y Tratamiento*. Mc; 2023. p. 31405730.
19. Hinson KFW, Moon AJ, Plummer NS. Broncho pulmonary aspergillosis. A review and a report of eight new cases. *Thorax*. 1952;7:317–33.
20. Chowdhary A, Agarwal K, Kathuria S, Gaur SN, Randhawa HS, Meis JF. Allergic bronchopulmonary mycosis due to fungi other than *Aspergillus*: A global overview. *Crit Rev Microbiol*. 2014;40(1):30–48.
21. Agarwal R, Muthu V, Sehgal IS, Dhooria S, Prasad KT, Aggarwal AN. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *Clin Chest Med* [Internet]. 2022;43(1):99–125. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2021.12.002>
22. Rodríguez-Orozco A, Méndez-López TT, Moreno-Chimal K. Sensibilización a alérgenos fúngicos como causa de enfermedad alérgica respiratoria. Extractos alérgicos de hongos para diagnóstico y tratamiento. *Inmunoterapia. Archivos de Alergia e Inmunología Clínica*. 2014;41(4):137–42.
23. Alcalá L, Muñoz P, Peláez T, Bouza E. *Aspergillus* y aspergilosis. *Seimc* [Internet]. 2015;12(2):77–8. Disponible en: http://www.avideter.com/ftp_public/articulo782.pdf
24. Fortún J, Meije Y, Fresco G, Moreno S. Aspergilosis. Formas clínicas y tratamiento. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30(4):201–8.
25. Arenas R. *Micología medica ilustrada.pdf*. 5a ed. Ciudad de México: McGraw Hill Education; 2014.
26. Pitt J. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states. 1979. 1979 p.
27. Espino del Castillo Rodríguez A. Diversidad de micromicetes de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* (Trichocomaceae) y levaduras, asociada al suelo de la cueva de los riscos, Jalpan, Querétaro, México. Universidad Nacional Autónoma de México; 2009.

28. Orozco ARR, Villegas EV, Muñoz LT, Reyes HR, Chávez LAH, Garcidueñas SV. Géneros fúngicos aislados de pacientes con rinitis alérgica y su relación con la prueba de hipersensibilidad subcutánea de Prick. *Revista Mexicana de Micología*. 2008;28.
29. Jiménez-fernández D, Montes-borrego M, Navas-cortés JA, Jiménez-díaz RM, Landa BB. Identification and quantification of *Fusarium oxysporum* in planta and soil by means of an improved specific and quantitative PCR assay. 2010;46:372–82.
30. Pemán J, Salavert M. Enfermedad fúngica invasora por *Scedosporium*, *Fusarium* y *Mucor*. *Rev Iberoam Micol*. 2014;31(4):242–8.
31. Fernández-sampedro M, Armi C, Carmen M. Formas clínicas y tratamiento de las infecciones causadas por otros hongos filamentosos. 2012;30(7):414–9.
32. Hofmann LM. La sarna plateada (*Helminthosporium solani*) una enfermedad de creciente importancia en papa. *Agronomía mesoamericana*. 2009;20(2):417–31.
33. López-vásquez JM, Leonor M, Ángel M, María A, Gutiérrez L. Journal of the Faculty of Sciences, Pontificia Universidad Javeriana. 2013. Factores climáticos y su influencia en la expresión de enfermedades fúngicas en cultivares de Heliconias.
34. Rodríguez-orozco AR, María D, Huato S, Hitzuri D. Perfil de consulta en niños alérgicos provenientes de familias de bajos ingresos. 2007;79(3).
35. Rivas LM, Mühlhauser M. *Alternaria* spp. *Revista Chilena de Infectología*. 2014;31(5):605–6.
36. Pavón Moreno MÁ, González Alonso I, Martín de Santos R, García Lacarra T. Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutr Hosp*. 2012;27(6):1772–81.
37. Bedolla-barajas M, Morales-romero J, Hernández-colín DD, Arévalo-cruz D. Prevalence of sensitization to common allergens in older adults of western México. *Artículo original Prevalencias de sensibilización a alérgenos más comunes en adultos mayores del Occidente de México. Rev Alerg Mex*. 2012;59(3):131–8.
38. Commons FW. *Alternaria alternata* conidia.jpg [Internet]. Disponible en: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Alternaria_alternata_conidia.jpg
39. Ryan, K.J. and Ray, C.G. Eds. *Sherris Medical Microbiology*. 4th Editio. New York; 2004. 2004 p.
40. Fernández-Soto R, Navarrete-Rodríguez EM, Del-Rio-Navarro BE, Sienra-Monge L, Meneses-Sánchez NA, Saucedo-Ramírez OJ. Fungal Allergy : Pattern of sensitization over the past 11 years. *Allergol Immunopathol (Madr)* [Internet]. 2018;1–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aller.2018.01.005>
41. Taniguchi M. Guía de tratamiento médico de la micosis broncopulmonar alérgica. *Alerugi*. 2021;2021:274–81.
42. Committee GS. *Pocket Guide for Asthma Management and Prevention for adults, adolescents and children 6-11 years*. 2023.

43. Mckeever TM, Britton J. Pulmonary Perspective Diet and Asthma. 2004;(25).
44. Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2003;361(9358):681–9.
45. O’Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *The Lancet* [Internet]. 2009;373(9678):1891–904. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60327-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60327-5)
46. Verhoef A, Hlgglns JA, Thorpe CJ, Marsh SGE, Hayball JD, Lamb JR, et al. Clonal analysis of the atopic immune response to the group 2 allergen of *Dermatophagoides* spp. : identification of HLA-DR and -DQ restricted T cell epitopes. *Int Immunol*. 1993;5(12):1589–97.
47. Thakur R, Anand R, Tiwari S, Singg AP, Tiwary B, Shankar J. Cytokines induce effector T-helper cells during invasive aspergillosis ; what we have learned about T-helper cells ? *Front Microbiol*. 2015;6(May):1–6.
48. Santana Rodríguez C, Rivas Jueas C, Emilio García Fernández M, Rodríguez SC, Jueas RC, Fernández G. Aeroalérgenos: pólenes, ácaros, hongos, animales y otros. Medidas de evitación. *Protoc diagn ter pediater* [Internet]. 2019;(1):65–85. Disponible en: www.allergen.org
49. Simon-Nobbe B, Denk U, Pöll V, Rid R, Breitenbach M. The spectrum of fungal allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;145(1):58–86.
50. Agarwal R, Singh I, Valliappan S, Raja M, Armstrong- D. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in India. *Clinical Experimental Allergy*. 2023;53(January):751–64.
51. Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;63(4):e1–60.
52. Biorender.
53. Okada N, Oguma T, Shiraishi Y, Nishimura T, Hattori S, Tanaka J, et al. Repeated exacerbation by environmental exposure and spontaneous resolution of allergic bronchopulmonary mycosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* [Internet]. 2021;9(1):558-560.e1. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.08.023>
54. Cramer R, Zeller S, Glaser AG, Vilhelmsson M, Rhyner C. Cross-reactivity among fungal allergens: a clinically relevant phenomenon? *Mycoses*. 2009 Mar;52(2):99-106. doi: 10.1111/j.1439-0507.2008.01644.x. Epub 2008 Oct 18. PMID: 18983424.
55. Agarwal R, Dua D, Choudhary H, Aggarwal AN, Sehgal IS, Dhooria S, et al. Role of *Aspergillus fumigatus* - specific IgG in diagnosis and monitoring treatment response in allergic bronchopulmonary aspergillosis. 2016;(July):1–7.
56. Sircar G, Chakrabarti HS, Saha B, Gupta-bhattacharya S. Identification of aero-allergens from *Rhizopus oryzae* : An immunoproteomic approach. *J Proteomics* [Internet]. 2012;77:455–68. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.09.023>
57. López-Pacheco MC, Pimentel-Hernandez C, Rivas-Mirelles. E, Arredondo. Garcia JL. Normatividad que rige la investigación clínica en seres humanos y requisitos que debe

cumplir un centro de investigación para participar en un estudio clínico en México. Acta
Pediátrica México. 2016;37 (3):175.