



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**Detección de *Alternaria* en muestras ambientales del
Valle de Toluca**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

(Idónea Comunicación de Resultados)

Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA

Mejía Góchez Amalinalli Guadalupe

Matrícula
2142800639

COMITÉ TUTORAL

Director: Dra. María Judith Castellanos Moguel

Codirector: Dr. Raúl Venancio Díaz Godoy

Asesor: Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez

Índice

1. Abreviaturas y Acrónimos	6
2. Resumen	8
3. Abstract	8
4. Introducción	9
5. Marco Teórico	12
5.1 Contaminación atmosférica	12
5.2 Hongos como patógenos en la Atmósfera	13
5.3 <i>Alternaria</i>	14
5.4 Estrategias de supervivencia y dispersión	15
5.5 Impacto de la presencia de <i>Alternaria</i> en la atmósfera sobre la Salud Humana	17
5.5.1 Determinantes Alergénicos	17
5.5.2 Potencial Patogénico	20
5.6 Agente proteolítico y queratinolítico	22
5.7 Revisión de casos clínicos	25
6. Hipótesis	28
7. Objetivos	28
7.1 Objetivo General	28
7.2 Objetivos Particulares	28
8. Materiales y Métodos	29
8.1 Área de Estudio	29
8.2 Parámetros meteorológicos	30
8.3 Muestreo	30
8.3.1 Aislamiento de Colonias Fungicas	30

8.4	Identificación mediante criterios morfológicos	32
8.4.1	Identificación macromorfológica	32
8.4.2	Identificación micromorfológica	33
8.5	Purificación en medio PDA	34
8.6	Cálculos de propágulos/ml en cámara de Neubauer	34
8.7	Determinación de actividad proteolítica	35
8.8	Determinación de actividad queratinolítica	36
8.8.1	Agar de sales con plumas de ave trituradas	36
8.8.2	Agar agua con plumas de ave	38
8.9	Análisis Estadístico	39
9.	Resultados	40
9.1	Clasificación taxonómica de los géneros encontrados en el Valle de Toluca	40
9.2	Abundancia y diversidad de géneros encontrados en el en el Valle de Toluca	43
9.3	Morfología de los géneros más abundantes	45
9.4	Variación estacional de las esporas aerotransportadas	47
9.5	Variación de las esporas aerotransportadas por Estaciones de monitoreo	50
9.5.1	Estación de monitoreo San Cristóbal	50
9.5.2	Estación de monitoreo Aeropuerto	52
9.5.3	Estación de monitoreo Oxtotitlán	54
9.5.4	Estación de monitoreo San Mateo	55
9.6	Abundancia de <i>Alternaria</i> por épocas anuales y estaciones de monitoreo.	57

9.7	Correlación entre <i>Alternaria</i> y los parámetros ambientales	58
9.8	Aislamiento de <i>Alternaria</i> en medio PDA	58
9.9	Actividad proteolítica de <i>Alternaria</i>	59
9.10	Actividad queratinolítica de <i>Alternaria</i>	61
9.11	Índice de crecimiento y desarrollo fúngico (ICDF)	64
9.12	Observaciones diarias	67
10.	Discusión	68
11.	Conclusión	72
12.	Literatura citada	74

Agradecimientos

A mis asesores, la Dra. Judith Castellanos Moguel y al Dr. Raúl Venancio Díaz Godoy, gracias por darme la confianza y la oportunidad de trabajar con ustedes, por todo el conocimiento brindado, por ser guías y mentores, por la paciencia, apoyo y comprensión, siempre.

A la Lic. Airam López Urbina y al Lic. Gabriel Hernández Pérez por representar una pieza clave dentro de este proyecto, al ayudar en la realización de los muestreos y obtención de datos.

A la Red Automática de Monitoreo Atmosférico del Valle de Toluca (*RAMAT*), a la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco (*UAM-X*), al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (*CONACYT*), al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (*ININ*) y al Laboratorio de Micología, por hacer posible este proyecto.

A la Dra. Guadalupe Prado y al Dr. Reyes López Ordaz por sus enseñanzas y apoyo incondicional dentro de la maestría.

Al Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez y a la Dra. Leonor Mendoza Vargas por el apoyo teórico.

A mis compañeros de laboratorio y maestría que contribuyeron en la retroalimentación de este estudio, con sus críticas, observaciones y conocimiento.

A mi esposo Diego Emmanuel por siempre apoyarme en cada uno de mis pasos profesionales, por confiar en mí siendo incondicional, pero sobre todo por ser mi inspiración para poder comenzar esta nueva etapa.

A mi hijo Murat por ser la razón de mi vida, el motivo por el que quiero mejorar cada día, por ser el regalo más bello y el orgullo más grande. No ha sido fácil pero ha valido totalmente la pena.

A mi madre y hermanos por todo el apoyo brindado antes y después de esta aventura; a mi padre que aunque no está físicamente, siempre me acompaña a través de sus enseñanzas y convicciones, muchas gracias a todos por formara parte de este sueño.

1. Abreviaturas y Acrónimos

Abreviatura o Acrónimo	Significado
CD8	Células T-8
CD4	Células T-4
CDMX	Ciudad de México
CONAPO	Consejo Nacional de Población
°C	Centígrados
CCEC	Cámara de Ambiente Controlado por Computadora
g/L	Gramos por litro
ICBN	Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas
ICDF	Índice de Crecimiento y Desarrollo Fúngico
IHME	Instituto para la Métrica y Evaluación de la Salud (Institute for Health Metrics and Evaluation)
IgE	Inmonoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
INECC	Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
ININ	Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares
IRA	Infecciones Respiratorias Agudas
JMP 8	Software Estadístico versión 8
kDa	Kilodalton
km/h	Kilómetros por hora
KOH	Hidróxido de Potasio
L/min	Litros por minuto
mg/L	Miligramos por litro
mL	Mililitros
Mycobank	Asociación Internacional de Micología
m ³	Metros cubicos
NHLBI	Instituto Nacional del Corazón, los pulmones y la Sangre (National Heart, Lung, and Blood Institute)
OMS	Organización Mundial de la Salud (WHO; World Health Organization)
PDA	Agar Papa Dextrosa
PM	Partículas Suspendidas (Particulate Material)
RAMAT	Red Automática de Monitoreo Atmosférico de Valle de Toluca
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato Sódico)
SEIMC	Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

SEMARNAT	Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TCR-TECORA	Sistema Analítico Industrial para PM
Th1	Linfocitos T helper 1
UAM-X	Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
µm	Micrómetros
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency)
ZMVT	Zona Metropolitana del Valle de Toluca

2. Resumen

En el presente estudio se obtuvieron muestras ambientales de la fracción PM_{2.5} durante el periodo Abril-Diciembre del 2014, con el propósito de realizar estudios proteolíticos y queratinolíticos del género *Alternaria* en la Zona del Valle de Toluca.

Se aislaron colonias fúngicas de los filtros para detectar contaminantes químicos y por impatación directa en cajas Petri en la fracción de PM_{2.5} en cuatro estaciones de monitoreo (San Mateo Atenco, Aeropuerto, San Cristóbal y Oxtotitlan) durante un periodo de nueve meses. A partir de estas muestras, se adquirieron colonias del género *Alternaria* por transferencia repetida en PDA con la finalidad de realizar estudios proteolíticos y queratinolíticos. De los datos obtenidos se llevaron a cabo análisis de abundancia y frecuencias, Índices Enzimáticos, Índice de Crecimiento y Desarrollo Fúngico (ICDF), correlación de Pearson entre *Alternaria* y los parámetros ambientales considerados, así como una prueba de Kruskal-Wallis entre las cepas de este género.

En el Valle de Toluca se encontraron más de 100 géneros fúngicos, de los cuales 5 de ellos fueron los más abundantes, incluida *Alternaria*. Las colonias aisladas de este género presentaron correlación positiva con los parámetros dirección del viento ($r=0.8$ y $r^2=0.6$) y humedad relativa ($r=0.9$ y $r^2=0.9$). En cuanto a la actividad proteolítica y queratinolítica, las cepas mostraron tener efecto positivo en los tratamientos, mientras que sus capacidades enzimáticas fueron similares; por lo que se considera que el género *Alternaria* probablemente posea el aparato enzimático idóneo para degradar proteínas y queratinas.

Palabras Clave: *Alternaria*, hongos, enzimas proteolíticas y queratinolíticas, procesos de infección o colonización, Valle de Toluca.

3. Abstract

In the present study, environmental samples were obtained of the PM_{2.5} fraction, during the period April-December 2014, for the purpose of conducting proteolytics and keratinolytic studies of the genus *Alternaria* in the Valley of Toluca.

Fungal colonies were isolated from the filters to detect chemical contaminants and by direct impaction in Petri dishes in the fraction of PM_{2.5} at four monitoring stations (San Mateo Atenco, Airport, San Cristóbal and Oxtotitlan) during a period of nine months. From these samples, colonies of the genus *Alternaria* were acquired by repeated transfer in PDA for the purpose of carrying out proteolytic and keratinolytic studies. They were made analysis of abundance and frequencies, Enzymatic Indexes, Fungal Growth and Development Index (FGDI), Pearson correlation between *Alternaria* and the environmental parameters considered, as well as a Kruskal-Wallis test between strains of this genus.

In the Toluca Valley, more than 100 fungal genera were found, of which 5 of them were the most abundant, including *Alternaria*. The isolated colonies of this genus showed positive correlation with the wind direction parameters ($r = 0.8$ and $r^2 = 0.6$) and relative humidity ($r = 0.9$ and $r^2 = 0.9$). Regarding the proteolytic and keratinolytic activity, the strains showed a positive effect in the treatments, while their enzymatic capacities were similar; so in this study it is considered that the genus *Alternaria* probably possesses the ideal enzymatic apparatus able to degrade proteins and keratins.

Keywords: *Alternaria*, Fungi, proteolytic and keratinolytic enzymes, infection or colonization processes, Valley of Toluca.

4. Introducción

La problemática ambiental toma dimensiones globales, debido al deterioro vinculado con las actividades antropogénicas realizadas en diversas partes del mundo, comprometiendo no solo la integridad de las personas, también de los organismos y los ecosistemas. La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014) estima que 7 millones de muertes anuales se deben a la contaminación del aire, de las cuales el 88% de estas incidencias se generan en países de bajos y medianos ingresos, recayendo la mayor carga en el Pacífico Occidental y el Sur de Asia Oriental (Figura 1).

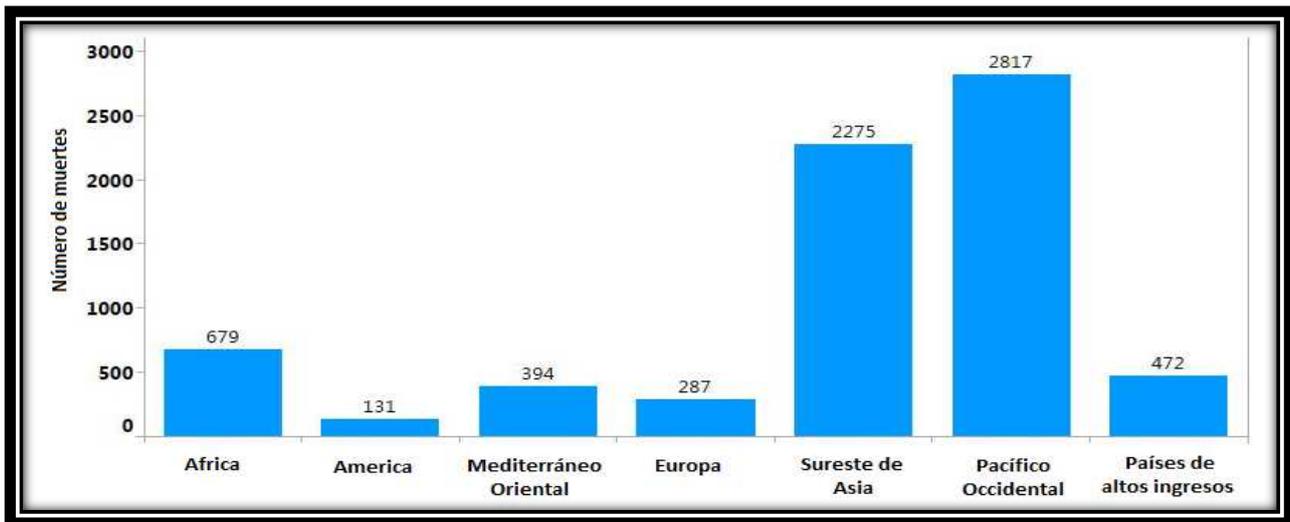


Figura 1. Gráfica anual de muertes atribuidas a la contaminación en el aire durante el periodo 2012 (modificado de OMS, 2014).

En lo que respecta a México se sabe que es uno de los países más poblados del mundo, cuenta con más de 112 336 538 habitantes (INEGI, 2010), de los cuales se estima que cada año mueren aproximadamente 14 700 por contaminación en el aire (WHO, 2012). En 2010, El Instituto para la Métrica y Evaluación de la Salud (Institute for Health Metrics and Evaluation o IHME) estimó que la contaminación del aire en México por partículas suspendidas fue la causa de 20 500 muertes, ocupando el noveno lugar como factor de riesgo (IHME, 2014).

En términos monetarios, en 2009 hubieron pérdidas económicas de 520 300 millones de pesos en costos ambientales generados por este tipo de contaminación, aunque no se especifica cuáles fueron (INEGI, 2011); mientras que en cifras más recientes la INEGI menciona que la contaminación atmosférica representó uno de los mayores costos ambientales en 2012, al situarse en 532 679 millones de pesos, equivalente al 3.4 por ciento del Producto Interno Bruto (INEGI, 2014a). Por lo que para proteger la salud pública y el medio ambiente, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) estableció estándares para seis contaminantes comunes del aire, conocidos como contaminantes criterio:

- ❖ Ozono
- ❖ PM (partículas suspendidas)

- ❖ Monóxido de Carbono
- ❖ Dióxido de Nitrógeno
- ❖ Dióxido de Azufre
- ❖ Plomo

Gran parte de la problemática de estos contaminantes radica en que las normas Mexicanas para evaluar la calidad del aire son menos estrictas que las planteadas por la OMS (Tabla 1). A continuación los parámetros de México y la OMS en cuanto a partículas suspendidas en un rango aerodinámico de 2.5 μm ($\text{PM}_{2.5}$) y 10 μm (PM_{10}).

OMS (2005)	México (NOM-025-SSA1-2014)
$\text{PM}_{2.5}$	$\text{PM}_{2.5}$
10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ anual 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ diarios	12 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ anual 45 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ diarios
PM_{10}	PM_{10}
20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ anual 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ diarios	40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ anual 75 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ diarios

Tabla 1. Comparativa de parámetros recomendados para $\text{PM}_{2.5}$ y PM_{10} , planteados por la OMS (2005) y México (NOM-025-SSA1-2014; publicada en el Diario Oficial de la Federación, 2014).

Como se ve reflejado en el informe Nacional de Calidad del Aire publicado por INECC y SEMARNAT en veintidós Ciudades Mexicanas, dentro de las cuales se considero la Zona Metropolitana de Valle de Toluca (ZMVT), León, Ciudad Juárez y Tijuana durante el periodo 2000 al 2013 (Figura 2). Se pone de manifiesto que las zonas de muestreo superan la normatividad mexicana respecto al promedio diario (75 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) y promedio anual (40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) establecidos por la NOM-025-SSA1-2014. La problemática es la misma para los sitios al contrastarlos con lo recomendado por la OMS (promedio diario de 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ y promedio anual de 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), por lo que se infiere que aun tratando de mantener los estándares estos resultaron elevados (Informe Nacional de Calidad del Aire, 2013).

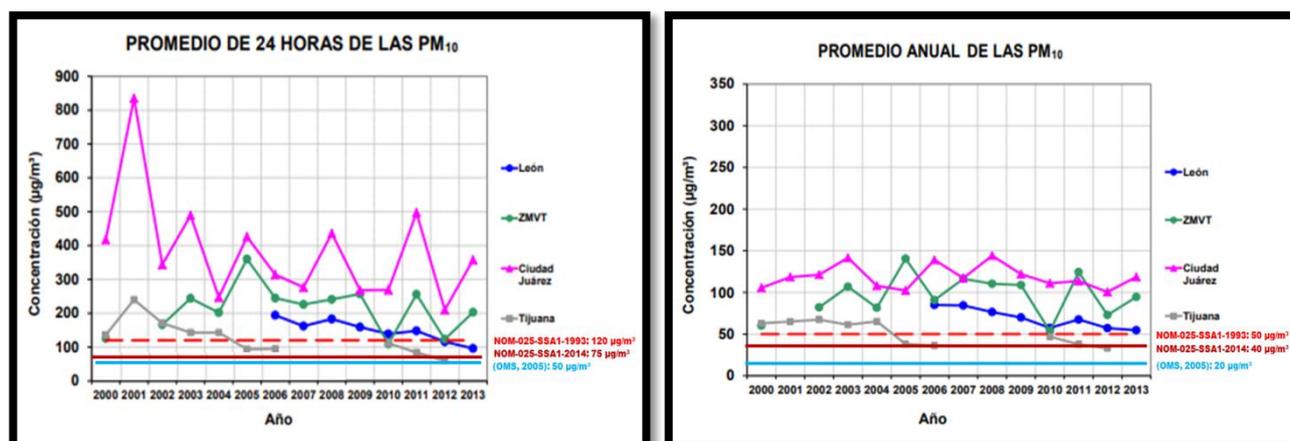


Figura 2. Promedios de PM_{10} en las cuatro zonas de monitoreo; ZMVT, León, Ciudad Juárez y Tijuana en comparación con la NOM-025-SSA1 publicada en 1993 y 2014, mostrando valores de 24 horas y anuales. La primera gráfica muestra los valores promedio de 24 horas, mientras que la segunda muestra los valores promedio anuales contrastados con lo recomendado por la OMS (modificado de Informe Nacional de Calidad del Aire, 2013).

Cabe destacar que la zona Metropolitana del Valle de Toluca tuvo un incremento del año 2002 al 2005 en cuanto a PM_{10} , lo que se le puede vincular con algunas enfermedades ocasionadas a la población. En 2010 el Gobierno del Estado de México proporcionó información de nuevos casos registrados por infecciones respiratorias agudas (IRA) y defunciones hospitalarias durante el periodo 2002 al 2009 (Figura 3). Los acontecimientos por enfermedades respiratorias agudas tuvieron un incremento del año 2002 al 2004, teniendo su mayor auge en el año 2003 con 5 309 759, mientras que las defunciones hospitalarias aumentaron del año 2005 al 2009, repuntando en el año 2006. Con base en esto se podrían vincular este tipo de partículas suspendidas como factores desencadenantes de enfermedades respiratorias y muertes producidas por el desarrollo y gravedad de estas mismas.

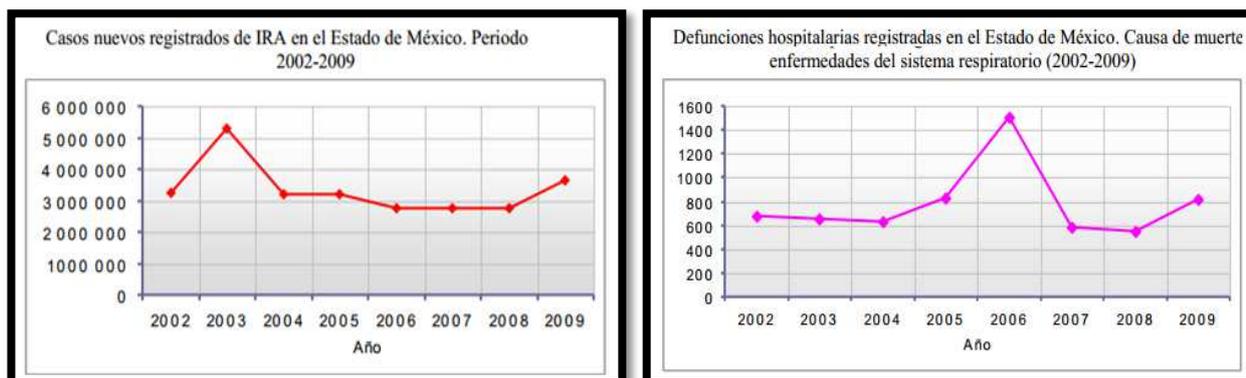


Figura 3. Casos nuevos de enfermedades respiratorias agudas (IRA) y defunciones hospitalarias durante el periodo 2002 al 2009 en el Estado de México (Gobierno del Estado de México, 2010).

En lo concerniente a las $PM_{2.5}$, la OMS (2014) analizó la calidad del aire en 1600 ciudades de 91 países, entre ellas las ciudades más pobladas de México; siendo Monterrey, Toluca, Distrito Federal y Puebla las más contaminadas por estas finas partículas (Figura 4). Por lo que ese mismo año la OMS vinculó la contaminación atmosférica como responsable de la muerte de al menos 3.7 millones de personas menores de 60 años en el año 2012.

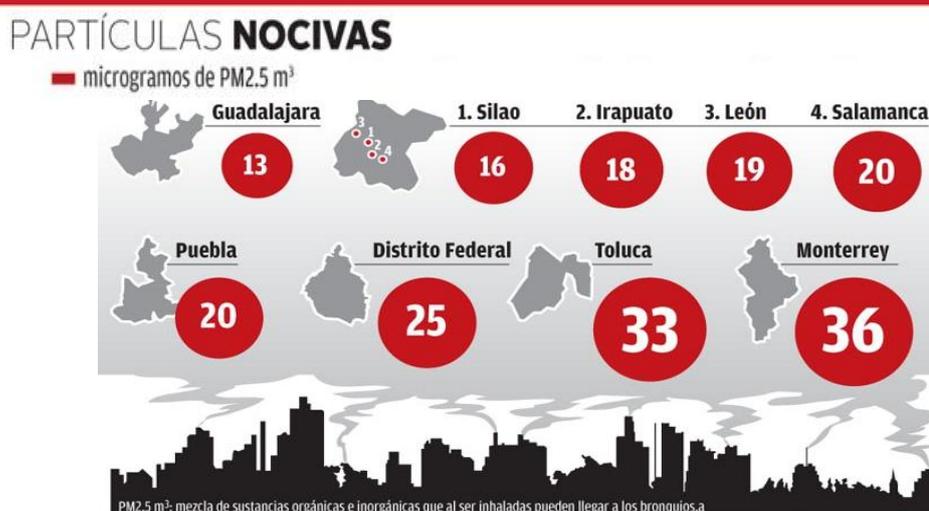


Figura 4. Promedio de $PM_{2.5}$ por m^3 en 1600 ciudades de 91 países. Considerando en México: Guadalajara, cuatro ciudades de Guanajuato, Puebla, Distrito Federal, Toluca y Monterrey (modificado OMS, 2014).

A causa de lo anterior se considera que al encontrarse los hongos dentro del material particulado, las colonias fúngicas son consideradas emisoras de esporas potencialmente patógenas a la atmósfera ocasionando un alto impacto sobre la salud pública. En el caso de *Alternaria* es uno de los géneros fúngicos más abundantes e importantes a nivel mundial, ya que logra afectar a organismos de origen vegetal y mamíferos, incluyendo el ser humano. Por lo que en este proyecto se detectó la presencia de *Alternaria* en la atmósfera del Valle de Toluca, así como las capacidades proteolíticas y queratinolíticas de estos aislados, como indicador de patogenicidad en mamíferos.

5. Marco Teórico

5.1 Contaminación atmosférica

La contaminación atmosférica es una alteración de la composición física y química del aire, que en los últimos años ha mostrado un incremento sobre todo en lugares urbanos debido a la emisión y dispersión de contaminantes originados principalmente por actividades antrópicas, condiciones climáticas y meteorológicas, la topografía del lugar, así como componentes orgánicos e inorgánicos (Romero, 2011), desencadenando problemas ambientales, sociales, económicos y de salud pública.

Dentro de los componentes que se hallan en el aire encontramos un grupo de partículas suspendidas denominadas $PM_{2.5}$ y PM_{10} , que se encuentran dentro del intervalo aerodinámico de 2.5 a 10 μm , respectivamente. Están constituidas por pequeñas fracciones de polvo, cenizas, hollín, polen, cemento, mohos, tierra, metales pesados, residuos de diésel, esporas, quema de combustibles, incluidos los vehículos automotores, plantas generadoras de energía, derivados de la quema residencial de madera, incendios forestales, quemas agrícolas y algunos procesos industriales que incrementan considerablemente su toxicidad (Bond, 2004).

Varios estudios epidemiológicos demuestran que las vinculaciones de alérgenos y algunos factores de patogenicidad en humanos están fuertemente relacionados con este material particulado suspendido; no obstante, una parte de estas partículas suspendidas son de origen biológico denominados bioaerosoles, en los que se pueden encontrar microorganismos cultivables o muertos, que son cuantificables (Hernández-Calleja, 2008). Están constituidos por virus, bacterias, hongos, polen y en general cualquier resto de microorganismos con un diámetro aerodinámico de 0.5 a 100 μm (Caballero-Segura *et al.*, 2005), sin embargo las que se encuentran en el espectro aerodinámico de 2.5 a 10 μm tienen la facilidad de ingresar por vía respiratoria al ser imperceptibles, causando diversas enfermedades e incluso la muerte (Andersen *et al.*, 2012).

Dado lo anterior, del tamaño de las partículas va a depender su capacidad para entrar en el organismo. Las partículas mayores a 10 μm se depositan en la nariz y garganta, mientras que las menores a 10 μm se les conoce como fracción torácica o inhalable y puede llegar a

penetrar hasta el tracto respiratorio; en cuanto a las partículas finas de 2.5 μm tienen la habilidad de llegar hasta los bronquiolos y alveolos (Secretaría del Medio Ambiente, 2014).

Vale la pena señalar que la supervivencia, reproducción y dispersión en el aire de estos bioaerosoles está sujeta a las condiciones del entorno. Factores tales como la temperatura, humedad relativa, el movimiento del aire, la luz, temporada del año y sus propiedades físicas como tamaño, densidad y forma determinan la presencia de estas biopartículas en el ambiente (Hernández-Calleja, 2008; Galindo-Martínez, 2011). Los hongos al encontrarse dentro de este grupo de partículas son considerados como fuentes emisoras de conidios o esporas a la atmósfera desencadenando enfermedades respiratorias simples que en algunos casos se tornan graves y culminan con la muerte del individuo.

5.2 Hongos patógenos en la Atmósfera

De todos los tipos de microorganismos presentes en la atmósfera, los hongos representan el grupo más numeroso por su carácter cosmopolita, son descomponedores primarios de la materia orgánica de plantas y de animales en muchos ecosistemas, desempeñando papeles biológicos importantes (Christensen, 1989; Martínez-Hernández, 2013). Por otro lado, las esporas también representan un grupo numeroso dentro de la variedad de microorganismos presentes en la atmósfera, cuantificándose hasta cientos de miles en el aire (Oliveira *et al.*, 2006). El tamaño de las esporas de hongos puede variar de 2 a 500 μm , aunque lo común es que sean menores de 20 μm (Sáenz-Laín y Gutiérrez-Bustillos, 2003; Das y Gupta-Bharyacharya, 2008), algunas de ellas alcanzan concentraciones significativas en determinadas épocas ya que crecen dentro de prácticamente todos los nichos ecológicos, siendo responsables del elevado porcentaje de pacientes sensibilizados a estos aeroalergenos y diagnosticados con problemas de alergia, infecciones o micosis (Sabariego-Ruiz *et al.*, 2004; Giusiano, 2011).

En las últimas décadas, los hongos se han convertido en factor imperante de enfermedades en seres humanos, en específico de personas inmunodeprimidas o con trastornos subyacentes graves. Estos microorganismos actúan como patógenos oportunistas que ocasionan morbimortalidad, por lo que las incidencias por micosis invasivas, alergias, infecciones y toxicidad han incrementado en el transcurso del tiempo, así como el listado de patógenos fúngicos oportunistas (Murray *et al.*, 2009).

Diversos autores sugieren aproximadamente 500 mil géneros y especies fúngicas, aunque se estima que pueden existir entre 1 y 1.5 millones (Pontón *et al.*, 2002), 100 de ellos son reconocidos como alérgenos por sus características aerodinámicas, producción de toxinas y su impacto aun estando muertos. El Reino Fungi comprende hongos macro y microscópicos, se divide en cuatro Phyla denominados *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* y *Chytridiomycota*, de los cuales *Ascomycota* comprende el 50% de los hongos conocidos y aproximadamente el 80% de los hongos patógenos por ser el más extenso (Pontón *et al.*, 2002). Dentro de los Ascomicetos existe un grupo heterogéneo denominado *Dothideomycetes* que representa uno de los más numerosos y diversos con

aproximadamente 105 familias y más de 6 mil especies, entre ellos algunos patógenos de humanos (Hyde *et al.*, 2013). Generalmente suelen ser saprofitos que raramente se le encuentra parasitando a animales y algunos humanos, tal es el caso de *Bipolaris*, *Curvularia*, *Ulocladium*, *Cladosporium* y *Alternaria* (Silva-Barreto *et al.*, 2011). Estos dos últimos considerados como géneros de gran interés alergológico en México y otras partes del mundo (Rodríguez-Orozco *et al.*, 2009; Grinn-Gofrón y Rapiejko, 2009) por su frecuencia en el aire (Sabariego-Ruiz *et al.*, 2004).

Dos de los géneros más importantes por su potencial alérgeno son *Cladosporium* y *Alternaria*, aunque las concentraciones de *Cladosporium* (3000 esporas/m³) en el aire son mayores que las de *Alternaria* (100 esporas/m³) (Grinn-Gofrón y Rapiejko, 2009), existen más casos de personas alérgicas a este último con respuestas severas (Pontón *et al.*, 2002).

5.3 *Alternaria*

- **Taxonomía**

Es un género perteneciente a los Ascomicetos. Incluye alrededor de 276 especies (Simmons, 2007), de las cuales 44 de ellas se consideran ampliamente distribuidas en las regiones templadas (Rotem, 1994; Gutiérrez-Bustillo, 2014). Constituyen una parte natural de la microbiota fúngica en casi todas partes. Siendo un *dematiáceo* obscuro, perteneciente a la familia *Pleosporaceae* (Tabla 2).

Reino	Fungi
Phylum	<i>Ascomicetos</i>
Clase	<i>Pezizomicetos</i>
Orden	<i>Pleosporales</i>
Familia	<i>Pleosporaceae</i>
Género	<i>Alternaria</i>

Tabla 2. Taxonomía de *Alternaria*.

- **Distribución**

Es un saprobio cosmopolita que generalmente se encuentra afectando organismos de tipo vegetal, algunos de ellos de tipo ornamental y otros con gran valor agronómico. Posee una alta variedad de sustratos ya que se le ha encontrado en madera podrida, diferentes tipos de suelo, cuero, papel, semillas, productos agrícolas, animales y frecuentemente ha sido aislado del aire (Gutiérrez-Bustillo, 2014). Es un endófito muy común especialmente en regiones templadas, debido a que logra colonizar todos los estadios de las plantas y sus colonias son de crecimiento rápido (tres o cuatro días).

- **Morfología**

Al inicio de su crecimiento las colonias son de color gris o verde olivo, su consistencia es polvorosa y lanosa (Figura 5); después el centro se oscurece, mientras sus bordes permanecen grisáceos y su reverso se pone de color negro. Sus esporas o conidios son marrones, multicelulares, tabicados (transversal o longitudinal) o septados; claviformes o elipsoidales (Gutiérrez-Bustillo, 2014).

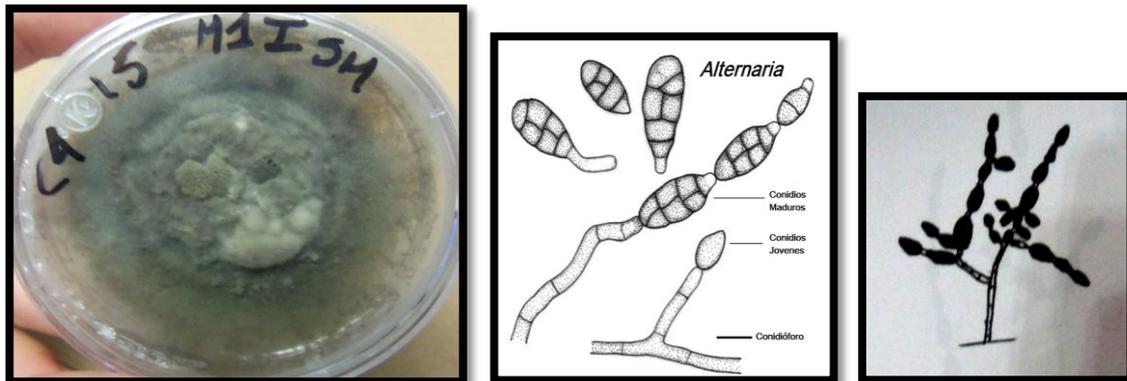


Figura 5. Morfología de *Alternaria* (modificado de Simmons, 2007; Tehnologija hrane©, 2012).

- **Ciclo de vida**

El hongo comienza afectando a las hojas provocándoles manchas marrones, que se incrementan hasta extenderse por toda la planta ocasionándole un deterioro generalizado que en la mayoría de los casos culmina en la muerte.

Su reproducción es por gemación en la célula apical, generando así largas cadenas de conidios, teniendo como temperatura óptima de 25°C a 28°C. Aunque su crecimiento varía dependiendo de diversos factores (Pónton *et al.*, 2002).

Este género incluye distintas especies universales y ubicuas, algunas de ellas considerados como fitopatógenos potenciales de tomate, papa, zanahoria, col, trigo, perejil, apio y algunas otras especies de valor agronómico. En algunas ocasiones llega a parasitar tubérculos como sucede en el caso de la papa y su actividad sobre el cultivo puede producir reducciones importantes en cuanto a calidad (Sinavimo, 2010).

5.4 Estrategias de supervivencia y dispersión

Alternaria es un género con la habilidad de desarrollarse en hábitats complicados de todo el mundo, parte de su desarrollo en estos lugares hostiles se debe a la capacidad para sobrevivir temporadas con clima frío, caliente y seco (Rotem, 1994).

Algunas especies de *Alternaria* pueden sobrevivir hasta 8 meses en temperaturas de hasta 36°C con el 90% de sus esporas (*A. cucumerina*). No obstante también existen especies con esporas longevas (*A. brassicicola*) que pueden durar en la atmósfera hasta 12 años

(Jackson, 1959; Maude y Humpherson-Jones, 1980). Para *Alternaria alternata* se han reportado periodos de supervivencia de hasta 7 años (Russell, 1958), siendo *A. porri* la especie con menor espectro de longevidad con 18 días (Nolla, 1927).

Este microorganismo cuenta con estructuras sofisticadas para subsistir en condiciones desfavorables, algunas de éstas aseguran la sobrevivencia del patógeno en ausencia de un huésped, como las clamidiosporas (Figura 6) que son esporas asexuales, generadas por el engrosamiento de un segmento de la hifa, para posteriormente desprenderse al medio, y son las esporas más resistentes de los hongos (García Cortés, 2004; Parke *et al.*, 2008).

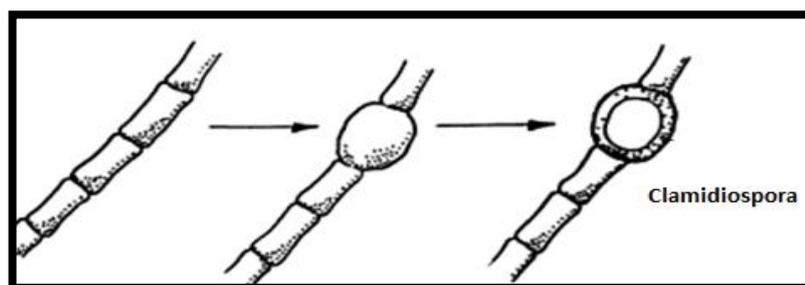


Figura 6. Esquema de la formación de clamidiosporas en hongos (modificado de García Cortés, 2004).

Otra de sus características está relacionada con la capacidad para tolerar los rayos UV que es atribuida a la melanina, pigmento natural de color negro que tiene la finalidad de proteger al microorganismo de la radiación (English and Gerhardt, 1946; Bell and Wheeler 1986).

La melanina le confiere a la célula fúngica:

- ❖ Protección frente al ataque de radicales libres producidos por las células fagocíticas (mecanismo de defensa del hospedero).
- ❖ Presenta capacidad de unión a enzimas hidrolíticas brindando protección a la membrana plasmática.
- ❖ Disminuye la acción de algunos antifúngicos (Jacobson 2000).

Su supervivencia también está vinculada con la tolerancia a factores abióticos como la temperatura, humedad y radiación, que alargan los períodos en los que el microorganismo puede continuar con su ciclo de vida y parasitar otros individuos. *Alternaria alternata* por ejemplo puede sobrevivir aproximadamente 300 días en suelos con poca humedad mientras que en climas secos su capacidad disminuye a 220 días (Hogg, 1966). Por otro lado Rotem en 1968 reportó que el micelio puede subsistir hasta 16 meses en temperaturas de hasta 40°C, mientras que las esporas a esa temperatura resisten hasta 10 meses. En 1994 este mismo autor menciona que diversas especies de *Alternaria* pueden subsistir a temperaturas elevadas y terminar sus procesos o ciclos de vida.

En lo que concierne a su dispersión, los conidios de *Alternaria* frecuentemente se encuentran en la atmósfera y en numerosos tipos de sustratos gracias a su carácter cosmopolita, sus largas cadenas de esporas y sus estructuras de resistencia. Su comportamiento durante la primavera y el otoño es favorable, incrementándose

diariamente. El número total de esporas fúngicas en el aire puede variar de <200 a >1000000 por m³, el periodo de emisión de conidios puede durar de 233 a 290 días y sus procesos de liberación, dispersión y deposición están fuertemente ligados a la hora del día, estación del año, localización geográfica, parámetros meteorológicos, horas de sol, e incluso corrientes de aire que diariamente pueden modificarse (Ruiz *et al.*, 2004). En el caso de *A. porri* sus esporas pueden dispersarse con ayuda del aire a una velocidad de 11 a 24 km/h, con un aproximado de 6 a 70 conidios por m³, respectivamente. Una vez que las partículas se encuentran en suspensión, su comportamiento aerodinámico estará gobernado por sus propiedades físicas como forma, tamaño y densidad, mientras que su desarrollo estará ligado a diferentes tipos de condiciones climáticas (Neiker, 2014) y a los ritmos circadianos.

5.5 Impacto de la presencia de *Alternaria* en la atmósfera sobre la Salud Humana

Los microorganismos pueden penetrar por tres vías en el organismo.

1. Cutánea-mucosa: Contacto directo con el foco de contaminación.
2. Digestiva: A través de las manos o indirectamente de forma accidental.
3. Respiratoria: La entrada de los microorganismos por la vía respiratoria es la más difícil de evitar, ya que se produce a través de los aerosoles (que pueden causar algún tipo de alergia, toxicidad o infección a los seres humanos (Sánchez-Monedero *et al.*, 2007)).

5.5.1 Determinantes Alergénos

En diversos estudios se ha comprobado la prevalencia de enfermedades respiratorias ocasionadas por hongos, siendo *Alternaria* uno de los principales alérgenos a nivel mundial (Lizaso *et al.*, 2003). De acuerdo con la normativa de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS) para *Alternaria* se han descrito 15 alérgenos (Tabla 3).

Nombre	PM (Kd)	Frecuencia (%)
Alt-1	31	80-90%
Alt a 1	30	86%
Alt a 29 k	29	-
Alt a 11563	31	-
Alt a 2	25	60%
Alt a 3	85	50%
Alt a 4	57	-

Alt a 5	45	50%
Alt a 6	11	8%
Alt a 7	22	8%
Alt a 10	53	8%
Alt a 12	11	-

Tabla 3. Alérgenos de *Alternaria alternata* (modificado de Løwenstein, 1983).

De los anteriores los principales son:

Alt a 1: Glicoproteína de 30 kDa reconocida por causar alergias en un 86% de las personas. Hasta el momento su funcionamiento es desconocido, sin embargo se sabe que se encuentra frecuentemente en el micelio y en el medio de cultivo.

Alt a 2: Tiene una masa atómica de 25 kDa, con función desconocida. Este alérgeno es reconocido por el 60% de pacientes.

Alt a 3: Es una proteína de choque térmico, con una masa de 85 kDa, reconocida por el 50% de los pacientes alérgicos a *Alternaria*.

Alt a 5: Tiene 46 kDa y es una enolasa. Es reconocida por el 50% de los pacientes sensibilizados a *Alternaria* (Breitenback *et al.*, 1997; Sáenz de Santamaría *et al.*, 2006).

Sin embargo, las patologías alérgicas son una de las facetas más desconocidas actualmente ya que éstas van a depender de la especie de hongo, las condiciones climáticas y la sensibilidad del individuo. Hay investigadores que delimitan estos elementos basados en el paciente tomando en cuenta la raza, especie, sexo y edad, a causa de que existen individuos más propensos que otros. También hay elementos que se enfocan en el estado de salud del sujeto, enfermedades crónicas (SIDA o diabetes), lugares con exceso de humedad o temperaturas elevadas, así como personas con una alta administración de fármacos (Barrera- Becerra *et al.*, 2006).

La mayoría de las enfermedades respiratorias son ocasionadas por agentes extraños por lo que el sistema inmunológico busca su exclusión; pero en algunos casos el sistema inmune reacciona de una manera excedida generando síntomas de alergia o algún tipo de hipersensibilidad. Dentro de las hipersensibilidades manifestadas por alérgenos fúngicos tenemos la tipo I, III y IV.

En la hipersensibilidad tipo I o inmediata, el antígeno sensibiliza los linfocitos B, provocando la producción de anticuerpos IgE que viajan por el torrente sanguíneo hasta llegar a los mastocitos quedando expuestos a la superficie a través de un receptor (Hernández-Calleja, 2008). Los mastocitos contienen mediadores que son los que originaran la alergia y se encuentran en la mucosa, ojos y piel (Zebeldia *et al.*, 2012). En cuanto hay una nueva exposición al alérgeno las células provocarán la activación y liberación de mediadores inflamatorios (histamina, triptasa, prostaglandinas y leucotrienos), desencadenando síntomas alérgicos (Figura 7); como brotes en la piel, prurito, inflamación, secreción de

mucosas, activación de plaquetas e irritación de terminaciones nerviosas. Estas reacciones tempranas se forjan entre las primeras 2 a 4 horas (Minguela-Puras y Moya-Quiles, 2005).

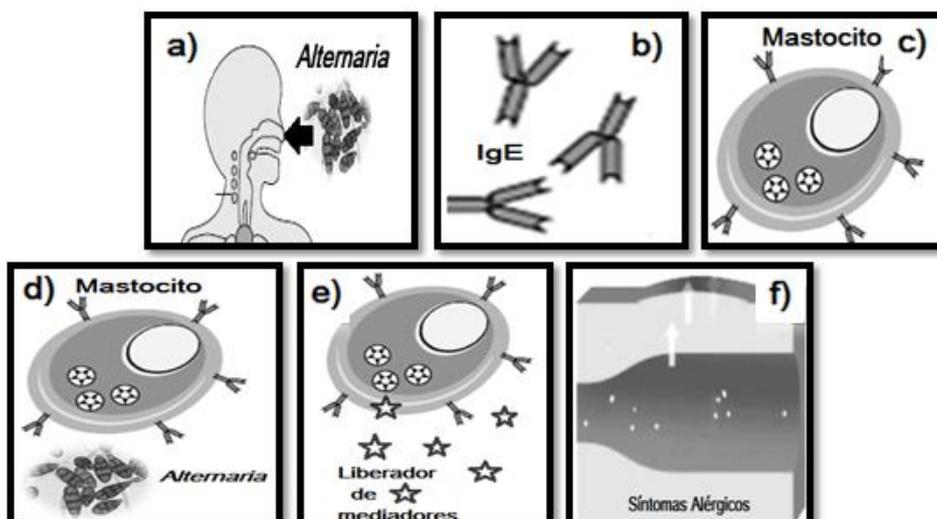


Figura 7. Mecanismo de acción alérgeno de *Alternaria* (modificado de Hernández- Calleja, 2008).

La respuesta anterior se presenta en casos de rinitis, asma, conjuntivitis y shock anafiláctico que son las reacciones más comunes a este tipo de alérgenos; por ende los primeros dos son los más frecuentes y que con el pasar del tiempo se complican con mayores efectos. En el primer caso mencionado, se muestran estragos en la fosa nasal generando una capa de mucosidad y paredes nasales inflamadas. Mientras que en el caso de pacientes asmáticos sus complicaciones inician al igual que la rinitis, en la apertura de fosa nasal, y finalizan con el engrosamiento de la pared de la vía respiratoria, ocasionada por el exceso de mucosidad en ella (Figura 8).

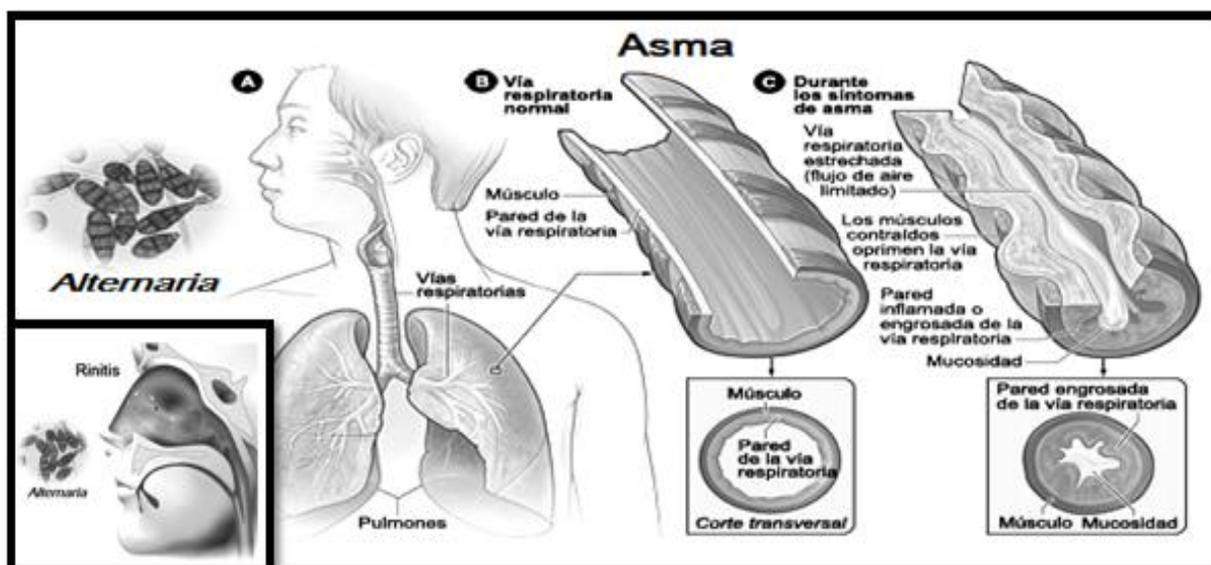


Figura 8. Esquema de las alteraciones por rinitis y asma en personas alérgicas a *Alternaria*. En el esquema de rinitis se muestra la inflamación ocasionada por el agente externo. En el segundo esquema en el inciso (a) se muestran las vías respiratorias y la ubicación de los pulmones, en el inciso (b) se muestran el corte transversal de una vía respiratoria sin alteraciones, en el inciso (c) se exponen los factores y la apariencia de la vía respiratoria durante los síntomas de asma (modificado de NHLBI, 2012).

La hipersensibilidad tipo III o retardada, ocurre cuando los antígenos y anticuerpos IgG o IgM se encuentran en grandes cantidades formando complejos inmunes. Los complejos inmunes grandes son eliminados por los fagocitos, mientras que los medianos no pueden ser eliminados con tanta facilidad activando así el complemento que causará la degranulación de los mastocitos y origina vasodilatación. Por lo que los complejos inmunes medianos son atrapados por los vasos sanguíneos u otros tejidos como glomérulos renales, activando el sistema complemento, el cual atraerá a los neutrófilos que degranularán y liberarán enzimas responsables del daño en los tejidos (Romero-Valdez, 2007).

En la hipersensibilidad tipo IV o tardía, la mediación no se lleva a cabo por anticuerpos, sino por células inmunitarias. Los linfocitos Th1 por medio de las moléculas CD8 y CD4 reconocen a los antígenos, provocando la activación de los macrófagos que buscan por objetivo eliminarlos, engulléndolos para generar posteriormente una molécula conocida como complejo mayor de histocompatibilidad. Los linfocitos Th1 reconocen el complejo, interactúan con el antígeno el cual se activará e incrementará en número. Cuando hay una nueva exposición, los linfocitos Th1 reaccionan con el conjunto presentado en el macrófago, liberando citocinas resultando en la atracción de más macrófagos, desencadenando inflamación y lesiones cutáneas (Romero-Valdez, 2007).

El género *Alternaria* ha sido asociado a diferentes padecimientos alérgicos entre ellos rinitis, bronquitis, neumonitis hipersensitiva y asma (O’Gorman y Fuller, 2008). En Australia se ha reportado que 1 de cada 10 niños presenta asma y 1 de cada 7 es alérgico a *Alternaria* (Mitakakis *et al.*, 2001); en cuanto a las micosis producidas por este género y otros hongos dematiáceos tenemos como principal factor la feohifomicosis, término que incluye las infecciones micóticas caracterizadas por la presencia de hifas septadas pigmentadas en el tejido (Rubio-Calvo *et al.*, 2001). Estas afecciones son posibles por las características aerodinámicas de *Alternaria*, su capacidad cosmopolita y su prevalencia en diferentes tipos de clima, incluyendo lugares abiertos como cerrados puesto que puede permanecer en la atmósfera por meses.

5.5.2 Potencial patogénico

Los casos por micosis originados por la invasión de parásitos fúngicos como *Alternaria* en tejidos a nivel superficial o profundo, varían en importancia, ya que pueden ir desde lesiones relativamente inocuas a enfermedades graves que amenazan la vida del hospedero. La OMS los clasifica clínicamente (López-Martínez, 2008) como:

Superficiales.

Afectan la epidermis, mucosas y faneras.

Cutáneas.

Afectan la epidermis, dermis, uñas y cabello.

Subcutáneas.

Afectan epidermis, dermis, tejido celular subcutáneo y en casos extremos pueden invadir el tejido muscular y óseo. En este tipo de micosis no se observan diseminaciones linfáticas o hematógenas.

Sistémicas o profundas.

Producidas por agentes etiológicos que se encuentran en el suelo, aire y que tienen fácil acceso al sistema respiratorio, se propagan por vía linfática y hemática, no son contagiosas pero se muestran de carácter grave.

Oportunistas.

Afectan a sujetos inmunodeprimidos o inmunocomprometidos. Es ocasionada por la microbiota normal del ambiente y su fuente de infección puede ser endógena o exógena.

Entre las condiciones predisponentes a infecciones invasivas generadas por hongos se encuentran la disfunción crónica de los injertos, inmunosupresores pretransplante, duración prolongada de operaciones, trasplantes, tiempos prolongados en hospitales o clínicas, inmunodepresivos u otros medicamentos extendidos por largos periodos (Ruíz-Camps *et al.*, 2010).

En diversos documentos se menciona a *Alternaria* como un patógeno oportunista de humanos, afectando principalmente a sujetos con sistema inmunológico bajo, con alguna lesión externa significativa o amputaciones. La vía de infección es exógena dado que aun estando en continua interacción, el hongo puede causar efectos secundarios en personas sensibles a él, por estar presente en los bioaerosoles ya que tiene la capacidad de ingresar por el sistema respiratorio, no obstante coexisten datos en los que se le ha encontrado afectando a nivel subcutáneo, ocular e interno (Palacio y Cuétara, 2009).

En datos de los últimos años se han registrado numerosos casos de personas afectadas por hongos ubicuos cosmopolitas como *Alternaria* y la patología se ha observado en pacientes con diabetes *mellitus*, broncopatía, quemaduras, insuficiencia cardíaca, enfermedades inflamatorias y en general por personas que han presentado inmunodepresión como la que surge en los trasplantes renales. En este último tipo de personas se les ha relacionado con riesgos de infecciones fúngicas (Gavela *et al.*, 2006), también hay información actualmente de casos similares pero con sujetos sanos (Romo *et al.*, 2009).

Cabe resaltar que *Alternaria* ha sido aislado de pacientes con onicomycosis, queratomycosis con traumatismos corneales o quirúrgicos y feohifomicosis subcutánea a través de traumatismos causados por espinas, astillas, ramas o agujas (Srinivasan *et al.*, 2004).

5.6 Agente proteolítico y queratinolítico

Se conocen más de 40 tipos de microorganismos capaces de degradar la queratina, incluyendo bacterias, actinomicetos y hongos (Pérez-Cárdenas, 2005). El sistema de la queratinasa degrada proteínas específicas, mediante un complejo de enzimas proteolíticas (Meevootisom y Niederpruem, 1979; Simpanya y Baxter, 1996). Estas enzimas tienen espectro de acción amplia ya que pueden hidrolizar una gran cantidad de proteínas solubles (caseína, gelatina, albúmina de suero, albúmina de huevo, hemoglobina, mioglobina, citocromo c) e insolubles (queratina, elastina, colágeno, fibrina, laminina, fibronectina) (Apodaca y McKerrow, 1989; Grzywnowicz *et al.*, 1989; Tsuboi *et al.*, 1989; Brasch y Zaldua, 1994).

Entendemos por queratina al grupo de proteínas fibrilares citoesqueléticas, de la familia de los filamentos intermedios y es una proteína con capacidad de endurecer el tejido en el que se acumula. A los tejidos cargados de queratina se les denomina queratinizados o cornificados. Esta proteína en grandes cantidades puede tornar un tejido duro como el de las garras de los grandes felinos o en los cuernos de un rinoceronte. En el ser humano, encontramos cantidades significativas de queratina en la epidermis, sobre todo en estratos superiores, y en los anexos cutáneos como las uñas y pelos (Navarro-Espinel, 1992).

La queratina se divide en dos grupos. Las queratinas ácidas y las básicas, estas subunidades están constituidas por una sola proteína, con morfología en forma de espiral (abundantes hélices alfa). Poseen cantidades especialmente abundantes de cisteína aunque la cantidad final es variable en función del tipo de queratina. En el ser humano, los tipos de queratina se pueden agrupar en dos conjuntos. Las queratinas blandas, que constituyen la epidermis y el vello fino, y las queratinas duras que forman parte de los pelos gruesos y de las uñas. Las primeras son más ricas en componentes hidrosolubles y más pobres en azufre, mientras que las segundas son más pobres en componentes hidrosolubles y más ricas en azufre (Navarro-Espinel, 1992).

Los hongos con la capacidad de utilizar la queratina como sustrato pueden clasificarse en tres grupos con base en su preferencia por el hospedero (Manzano-Gayosso, 2013).

- ❖ Antropofílicos. Hongos que parasitan el tejido humano. Se ha descrito que estas especies evolucionaron de los hongos zoofílicos y que gradualmente perdieron su afinidad por la queratina del hospedante original.
- ❖ Zoofílicos. Afectan a una gran variedad de aves y mamíferos.
- ❖ Geofílicos. Viven en el suelo como saprobios.

En cuanto a su mecanismo de acción los hongos queratinolíticos tienen la facilidad de ingresar al hospedero, adhiriéndose al estrato córneo de la piel, generando un eczema acompañado de manifestaciones alérgicas. Posteriormente invaden los queratinocitos originando días después una lesión circular descamativa con brotes en forma de anillos y

placas hiperqueratósicas. Generalmente este tipo de lesiones son espontáneas y su resolución puede ser fácil o tender a ser persistente o grave (Aroca *et al.*, 2007).

Las lesiones que producen estas infecciones dependen principalmente del nicho ecológico, estado inmune del paciente, factores ambientales y respuesta inmune inducida, pudiendo utilizar la queratina como sustrato nutritivo y/o energético, presentando así un sistema organizado y adecuado para metabolizar la queratina (Pérez-Cárdenas, 2005). Estos microorganismos poseen estructuras de resistencia que les permiten adherirse a los epitelios por medio de componentes como uniones de tipo lectina en el que las esporas por tigmotropismo se incrustan a ciertos sustratos (Perera *et al.*, 1997); permitiendo la germinación de los conidios, adhiriéndose a la queratina para tratar de penetrar partes más profundas de la piel al desarrollar hifas y otras estructuras de infección.

Otro mecanismo que facilita la penetración de la queratina, es la liberación de enzimas proteolíticas como las queratinasas (Viani *et al.*, 2001). Otros hongos utilizan la melanización como parte de la estrategia de penetración en estructuras originadas a partir de los conidios, llamados apresorios; los cuales ejercen una fuerte presión física sobre la pared celular de plantas. Este mecanismo de patogenicidad no se ha descrito que funcione en la infección a animales o humanos, sin embargo estudios hechos con *Wangiella dermatitidis* han demostrado que la presencia de la melanina juega un papel importante en la penetración de este hongo en el tejido de animales (Jacobson, 2000).

En lo que respecta a *Alternaria* pocos estudios han considerado su presencia como posible agente queratinolítico. Resulta aventurada la correlación de estos factores, ya que *Alternaria* es un dematiáceo y los patógenos verdaderos son dimórficos bajo dos aspectos morfológicos diferentes, uno de ellos es su fase levaduriforme que corresponde a células individualizadas, de forma más o menos ovalada, que se multiplican de modo asexual por un proceso de gemación (blastosporas), mientras que la fase dos o micelial que se caracteriza porque el hongo presenta abundantes hifas, generalmente con gran cantidad de esporas que le facilitan la penetración del huésped (Clínica Universidad de Navarra, 2013).

No obstante Blackwell en 2011, Casadevall en 2012 y Woolhouse and Gaunt en 2007 estimaron que de 270000 especies de hongos asociados con plantas, 325 de ellos afectan a humanos, los cuales son mayoritariamente dematiáceos. Mientras que Gugnani en el año 2000, incluyó algunos saprófitos comunes como *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Scopulariopsis*, *Curvularia* y *Alternaria* como hongos queratinófilos capaces de colonizar diversos sustratos de queratina. Dentro de la literatura citada por Gugnani se encontraron argumentos suficientes para sustentar que *Alternaria* puede fungir como agente degradador de queratinas o que al menos cuenta con el sistema adecuado para hacerlo.

En 1985 se describieron casos de infección cutánea humana debido a *A. alternata*, *A. humicola*, y *A. pleuriseptata* (Wadhvani *et al.*, 1985), donde el aspecto clínico de las lesiones cutáneas fue similar a las causadas por dermatofitos. En otros estudios con

preparaciones en KOH de los raspados de lesiones en la piel y de las uñas de pacientes enfermos, se observaron hifas septadas de dematiáceos. En el caso particular de las uñas afectadas por este género, su coloración se mostraba negruzca, con estado distrófico e hiperqueratosis subungueal. Mientras que en tres casos de onicomicosis se notificó la presencia de *A. humicola*, *A. pluriseptata*, y *A. alternata* nuevamente (Gugnani, 2000).

Posteriormente Rubio-Calvo *et al.*, en 2001 vincularon la posibilidad de que este hongo pudiera tener la capacidad de realizar procesos tan complicados como la queratomicosis. El elemento desencadenante son los traumatismos (Martínez-Hernández, 2013) donde éste se considera en un 55,3%, seguido de enfermedades sistémicas con un 11,2% y finalmente con cirugía de un 9,8% (Rubio-Calvo *et al.*, 2001).

En 2006 Apprich *et al.*, aislaron de los cascos de un equino algunos deuteromicetos dentro de los cuales se encontró *Alternaria*, con la capacidad de degradar algunas queratinas dérmicas, excepto las de 51 y 55.7 kDa. La actividad queratinolítica se evaluó con ayuda de las pruebas de SDS-PAGE electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio como agente desnaturizante y análisis de transferencia por Western Blot.

Mientras que en México, se registraron 209 pacientes con queratomicosis de los cuales se aisló a *Alternaria* de 3 casos, correspondiente al 4.5% de los aislados totales fúngicos en esta patología (Vanzzini *et al.*, 2010).



Figura 9. Diversos casos de micosis ocasionada por *Alternaria* en pacientes inmunodeprimidos. En las imágenes (a), (b) y (f) se observa Feohifomicosis cutánea (tomado de Gomes *et al.*, 2011); en las imágenes (c) y (d) se muestra un caso de infección corneal (tomado de Konidaris *et al.*, 2013), mientras que en la imagen (e) se presenta el “El extraño caso de *Alternaria alternata*” (tomado de Sečniková *et al.*, 2014). Imagen (g) y (h) *Alternaria infectoria* presente en perro con anemia hemolítica (Dedola *et al.*, 2009).

5.7 Revisión de casos clínicos

Las primeras menciones de las afectaciones de *Alternaria* en patología humana según la *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (SEIM) datan de 1929 en las que Montpellier *et al.*, lograron aislarla de un nódulo granulomatoso subcutáneo en el pie de un niño argelino. Henrici *et al.*, (1930) lo recuperaron de una lesión superficial y sugirieron que podría ser causa de lesiones supurativas benignas en el hombre. En 1933, Vilas-Boas y Martins comunicaron un caso de onicomicosis, a partir del cual cultivaron un hongo que denominaron *Epidermophyton nigricans* pudiendo ser considerado como *A. tenuis*, mientras que en 1935 Motta aisló *A. alternata* a partir del conducto auditivo externo humano (Rubio-Calvo *et al.*, 2001).

En la década de 1980 y 1990, se notificó que *Alternaria* era causante de hasta 33 casos de infecciones humanas (Viviani *et al.*, 1986). Singh *et al.*, en 1990 reportaron en varias partes del mundo infecciones cutáneas ocasionadas por algunas especies de *Alternaria* como *A. alternata*, *A. tenuissima* y *A. chlamydospora*, siendo asociadas con enfermedades o condiciones debilitantes.

En 2010 Ramos-e-Silva *et al.*, presentaron un caso de Feohifomicosis por *Alternaria* en un paciente con VIH. Gomes *et al.*, en 2011 encontraron en una mujer de 76 años con Feohifomicosis cutánea producida por *Alternaria alternata*. En 2012 se halló a 56 niños con rinitis inducida por *Alternaria* (Fuiano *et al.*, 2012). Shakurnia *et al.*, en 2013 reportaron la presencia de *Alternaria* en pacientes con enfermedades respiratorias, de 295 voluntarios el 8.1% presentaba sensibilidad al hongo. En 2013 Konidaris *et al.*, reportaron un caso de infección por *Alternaria alternata* en trasplante corneal en una mujer de 66 años.

Mientras que en 2014, Mimura *et al.*, reportaron a 13 niños con rinoconjuntivitis alérgica en el polvo, de los cuales 7 se mostraban sensibles a la presencia de *Alternaria tenuis*. Chakraborty *et al.*, seleccionaron 398 individuos entre 5 y 18 años con enfermedades alérgicas, en los cuales la sensibilización por *Alternaria tenuissima* mostró la respuesta positiva más alta con 40.70 %, seguido por *Alternaria alternata* con 21.35% y *Alternaria padwickii* con 4.02 %, de estas las más frecuentes en el ambiente fueron *Alternaria alternata* con 61.35 %, seguido por *Alternaria tenuissima* con 23.71 % y *Alternaria padwickii* con 11.05%. Salido-Vallejo *et al.*, este mismo año, mencionaron que de 18 casos de trasplantes, 15 de ellos fueron afectados por hongos incluyendo a *Alternaria*, algunos sin solución aparente y otros, en el mejor de los casos remediándolos únicamente con cirugía. Sečníková *et al.*, (2014) notificaron un caso de infección cutánea y pulmonar en un varón de 66 años receptor de trasplante cardíaco tratado por anti fúngico del grupo de los azoles, debido a su naturaleza insólita le denominaron “El extraño caso de *Alternaria alternata*”.

Sumado al reservorio de información documentada de las afecciones por *Alternaria* encontramos dos casos de micosis en animales en 2009, el primero fue reportado por Dye *et al.*, en el que nueve gatos domésticos fueron parasitados por este hongo, el segundo caso es mencionado por Dedola *et al.*, en un perro con anemia hemolítica, la micosis fue

ocasionada por *Alternaria infectaria* en la atmósfera. Cabe agregar que también se ha logrado aislar este hongo de equinos.

En cuanto a México y la CDMX, se han realizado estudios en los que se han logrado aislar del aire a *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Phialophora*, en temporadas secas mostrando tener abundancia (López-Martínez *et al.*, 1986; Rosas *et al.*, 1997) y alto potencial alérgico (Denning *et al.*, 2006).

Borja-Aburto *et al.*, reportaron estudios de mortalidad realizados a la población durante 1990 y 1992 que estuvieron fuertemente ligados con altos niveles de contaminación, en los que se estimó una muerte anual de hasta 4500 personas (Borja-Aburto *et al.*, 1997).

Calderón *et al.*, (1997), estudiaron el efecto del clima urbano en las esporas de Ascomicetos mitospóricos. La carga de conidios más grande fue en zona Sur de la Ciudad de México con el 52% en la zona urbana y el 65% en la zona urbana comercial; encontrando principalmente a *Cladosporium* y *Alternaria*, los cuales predominaron tanto en temporadas secas como en húmedas.

En (2000) Telles-Rojo *et al.*, reportaron en la Ciudad de México muertes por causas respiratorias crónicas y enfermedades de tipo pulmonar obstructiva crónica relacionadas con PM₁₀ en personas mayores de 65 años; durante ese año el promedio de PM₁₀ fue de 23.4-175.3 3 µg/m³ rebasando así la norma anual de PM₁₀ establecida para México.

López-Urbina (2011) reportó para la atmósfera adyacente a las estaciones de transporte público en la Ciudad de México un total de 10 052 Unidades Formadoras de Colonias (UFC), de las cuales en primavera se obtuvieron 409 UFC de *Alternaria*, lo que representó el 27% del total de los hongos encontrados para esa época del año. En este informe se indicó que *Alternaria* estuvo presente en las cuatro estaciones del año. Mientras que Galindo-Martínez (2011) en ese mismo año, cuantificó en cámara Neubauer el número de partículas obtenidas con ayuda de un muestreador para PM_{2.5} y registró en promedio 1, 378 787 partículas suspendidas en el Valle de México, mientras que en el Valle de Toluca se encontraron 958 400, confirmando así la alta carga de contaminación por bioaerosoles en ambas zonas. Durante este informe también se notificó la presencia de *Acladium*, *Acremodium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bipolaris*, *Botryoderma*, *Chaetophora*, *Chrysonilia*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Geotrichum*, *Mammaria*, *Memnoniella*, *Penicillium*, *Stachybotrys*, *Varicosporum* y *Alternaria* en la Zona del Valle de Toluca (Galindo-Martínez, 2011).

Martínez-Hernández en 2013, aisló y seleccionó 6 aislados de *Cladosporium* y *Alternaria* obtenidos de exudados nasales y de la atmósfera de la Ciudad de México, justificando que dichos géneros fueron seleccionados por ser los más predominantes en el aire. Durante este informe se evaluó el efecto del antifúngico ketoconazol por los siguientes métodos:

- a) Testigo sin antifúngico
- b) Medio con antifúngico

Concluyendo que los mejores resultados inhibitorios para ambos géneros se obtuvieron de la dilución del antifúngico en el medio de crecimiento (método C), siendo el menos productivo el método B.

Finalmente, Maldonado-Vega *et al.*, en 2014, evaluaron la calidad del aire en dos hospitales de León, Guanajuato, México en donde se reportaron concentraciones altas de bacterias y hongos en ambos sitios. En el hospital 1 se reportó para bacterias de 40 a 280 UFC/m³ mientras que en el hospital 2 con más años de servicio y mayor incidencia de pacientes se obtuvieron de 90 a 548 UFC/m³, con 17 géneros de bacterias en ambos casos. Mientras que para hongos en el hospital 1 se reportaron 15 géneros con una concentración de propágulos fúngicos que osciló entre 56 a 184 UFC/m³. En el hospital 2, se encontraron 22 géneros fúngicos y de 32 a 442 UFC/m³ dentro de las cuales se encontraban hongos de alta importancia clínica como *Microsporum audouinii*, *Cladosporium oxysporum*, *Mucor ramosissimus*, *Cryptococcus albidus* y *Alternaria arborescens*.

En virtud de lo señalado anteriormente se considera de carácter preponderante realizar estudios enfocados a la calidad del aire, así como el monitoreo de partículas suspendidas aerodinámicamente en el intervalo de PM_{2.5}, así como sus afecciones a la población. En lo que respecta a *Alternaria*, todas sus características la vuelven un modelo de estudio pertinente y vigente debido a su problemática agronómica y de salud pública, ya que no solo es un fitopatógeno, también es un patógeno oportunista de algunos mamíferos, incluyendo seres humanos.

6. Hipótesis

En los conidios fúngicos de los filtros provenientes del Valle de Toluca, es factible que esté presente *Alternaria*, por lo que posiblemente sea capaz de utilizar el tejido queratinoso como sustrato.

7. Objetivos

7.1 Objetivo General

Detectar hongos del género *Alternaria* en la atmósfera de la zona metropolitana del Valle de Toluca.

7.2 Objetivos Particulares

- 1.- Aislar *Alternaria* a partir de los filtros utilizados para detectar contaminantes químicos en la fracción de PM_{2.5} por la Red Automática del Monitoreo Atmosférico del Valle de Toluca.
- 2.- Obtener colonias de *Alternaria* por impactación directa en cajas Petri colocadas en los mismos sitios que los muestreadores para PM_{2.5}.
- 3.- Determinar la capacidad proteolítica y queratinolítica de *Alternaria* como indicador potencial de patogenicidad.

8. Materiales y Métodos

El presente proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de Micología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (*UAM-X*) en colaboración del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (*ININ*) y la Red Automática de Monitoreo Atmosférico del Valle de Toluca (*RAMAT*).

8.1 Área de Estudio

El Valle de Toluca (Figura 10) es una de zonas conurbadas más importantes del Estado de México. En datos obtenidos de las proyecciones CONAPO 2010 y el Censo Nacional de Población y Vivienda 2010, el Valle de Toluca está conformado por 15 municipios (INEGI, 2010) con una superficie de 2,669.6 km² a una distancia sobre el nivel del mar de entre 2,560 a 2,740. Cuenta con una población estimada de 2,152,552 habitantes; localizado en la parte central del Estado de México, entre los paralelos 18°59'07" y 19°34'47" de latitud Norte y los meridianos 99°38'22" y 99°56'13" de longitud Oeste con respecto al meridiano de Greenwich. En cuanto al tipo de clima, de acuerdo con la clasificación climática de Köppen (1900), modificado por E. García en 2004, están presentes tres tipos de clima: templado húmedo, semifrío subhúmedo y frío (Proaire, 2012).

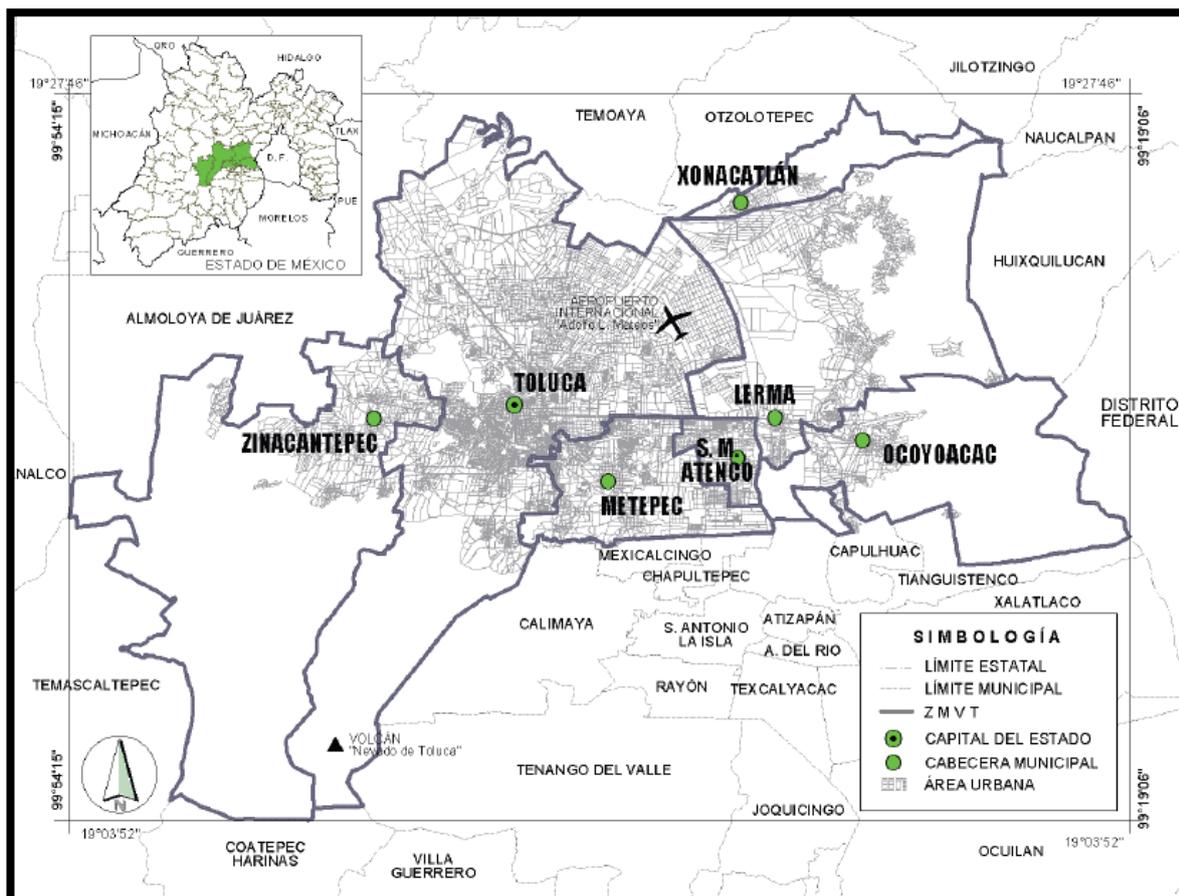


Figura 10. Mapa de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca (modificado de Proaire, 2007).

8.2 Parámetros meteorológicos

Estos fueron proporcionados por la Red Automática de Monitoreo Atmosférico de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca (*RAMAT*), de la que se obtuvo el promedio diario para temperatura del ambiente, humedad relativa y dirección del viento, de los días en que se tomaron las muestras de PM_{2.5}.

8.3 Muestreo

El muestreo se llevó a cabo durante diez meses, comenzando el 24 de Abril de 2014 y finalizando el 9 de Enero de 2015.

Las colonias de *Alternaria* utilizadas en éste estudio se obtuvieron de la atmósfera del Valle de Toluca, así como de los filtros para contaminantes químicos, utilizando equipos TCR-TECORA para PM_{2.5}. El material biológico se colectó de cuatro estaciones de monitoreo (Tabla 4) de la Red Automática de Monitoreo Atmosférico del Valle de Toluca (*RAMAT*).

Estación de muestreo	Ubicación	Localidad
San Mateo Atenco	Sur	San Mateo Atenco
Aeropuerto	Norte	San Pedro Totoltepec
San Cristóbal Huachotitlan	Norte	San Cristóbal Huachotitlan
Oxtotitlan	Centro	Oxtotitlan

Tabla 4. Estaciones de muestreo.

8.3.1 Aislamiento de colonias Fúngicas

Éstas se realizaron cada quince días en dos fases:

Impactación directa en cajas Petri

Se utilizaron cajas de 9 cm diámetro, con agar rosa bengala (BD DIFCO™) a una proporción: 32 g/L adicionado con ciprofloxacino 500 mg/L; ya que es el medio más recomendado para el crecimiento de hongos, restringiendo el tamaño y la altura de las colonias con crecimiento rápido. Esta restricción ayuda en el aislamiento de colonias de crecimiento lento, facilitando así el recuento. Mientras que el ciprofloxacino inhibe el desarrollo bacteriano (Koburger, 1976; Linares *et al.*, 2006).

Se colocaron dos cajas por estación de muestreo, expuestas durante 30 minutos en la parte superior de la estación (Figura 11); debido a que el impacto del aire en el suelo ocasiona el levantamiento del material particulado, provocando que este ingrese al organismo por vías respiratorias al ser aspiradas (Rosas *et al.*, 2004).

Las muestras obtenidas se trasladaron al laboratorio para su incubación a 28°C durante un periodo de 3 a 5 días, dando oportunidad a que las colonias fúngicas desarrollaran sus esporangios para su identificación *SAN* macro y microscópicamente.

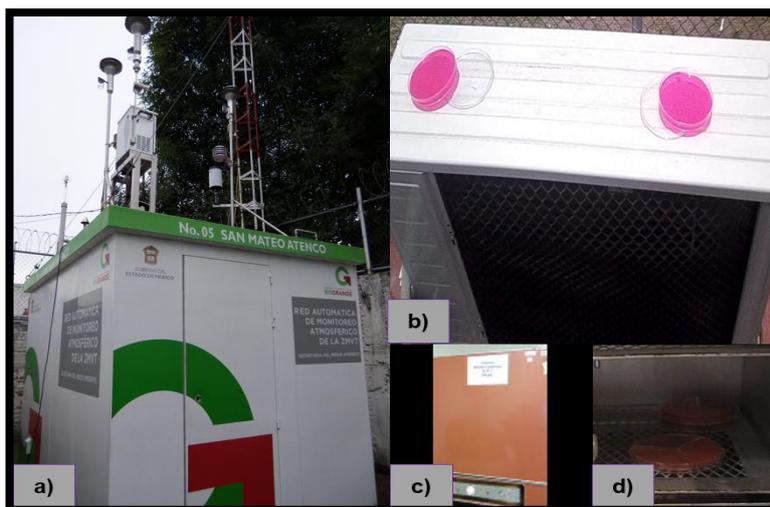


Figura 11. Toma de muestras por impactación directa en cajas Petri de las estaciones de monitoreo de la RAMAT.

Toma de filtros

Se utilizaron filtros de teflón con un diámetro de 47 mm para detectar contaminantes químicos en la fracción de $PM_{2.5}$ con ayuda de un muestreador TCR-TECORA (User Manual ECHO PM, 2003). Con éste procedimiento se determinó la presencia de conidios fúngicos en una proporción aproximada de 16 L/min durante un día, en la atmósfera del Valle de Toluca (Figura 12).

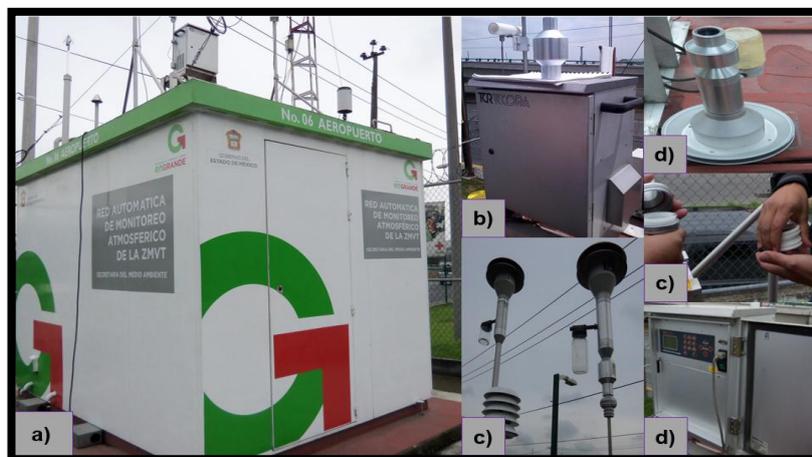


Figura 12. Toma de filtros de las estaciones de monitoreo de la RAMAT con el muestreador TCR TECORA para material particulado.

Cada muestra se manipuló como un ejemplar biológico colocándose en un porta filtro, siendo protegidos de la luz solar y manteniéndolos en refrigeración hasta su uso, con el fin de no modificar la composición y viabilidad de los conidios presentes en dichas muestras.

Para la obtención de conidios en cajas Petri, se tomó un trozo del filtro de aproximadamente 2 cm² y se colocó en un tubo Falcon con 1 ml de Tween 80 al 0.05% y se agitó en un vortex durante 1 minuto para hacer los lavados, el procedimiento se realizó 6 veces. La suspensión resultante del lavado del filtro se colocó en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 13000 rpm por 25 minutos. Posteriormente se tomó la pastilla y se re-suspendió nuevamente en 1 ml de Tween 80, de esta nueva suspensión se tomaron 100 µl que se vertieron en las cajas Petri (cinco por estación de muestreo) con rosa Bengala adicionado con ciprofloxacino (Figura 13).



Figura 13. Obtención de colonias fúngicas por medio de filtro en agar rosa Bengala.

Para su incorporación en el medio se utilizó un rastrillo de vidrio con el que se esparció todo el líquido en la caja hasta ser absorbido. La incubación se realizó a 28°C durante un periodo de 3 a 5 días para favorecer el crecimiento de las estructuras fúngicas, posteriormente se sometieron al procedimiento de identificación y caracterización.

8.4 Identificación mediante criterios morfológicos

De los aislados obtenidos por impactación directa y de filtros, se identificaron a nivel de género las colonias presentes, tomando en cuenta su macro y micromorfología.

8.4.1 Identificación macromorfológica

La caracterización de las colonias fúngicas se estableció con base a la forma, consistencia, superficie, exudado y color (Mier *et al.*, 2002; Solé, 2004).

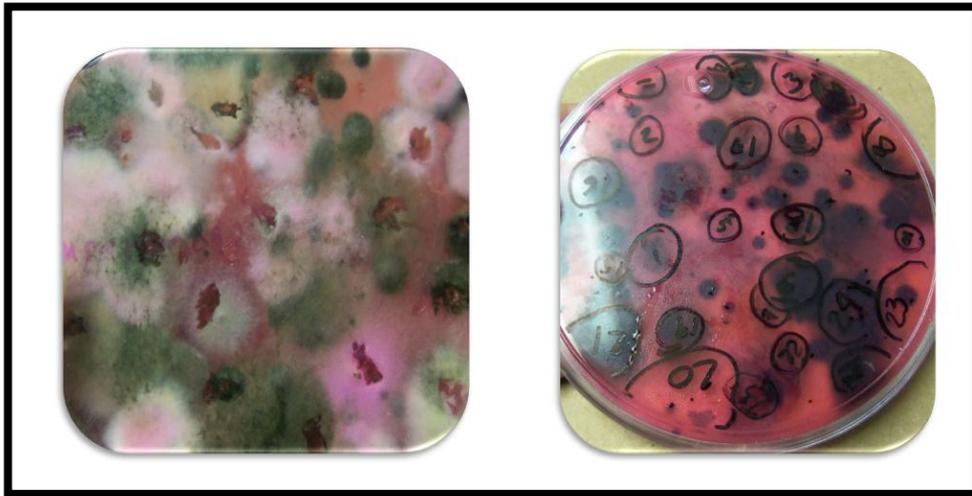


Figura 14. Identificación macromorfológica de las colonias obtenidas de la atmósfera del Valle de Toluca.

8.4.2 Identificación micromorfológica

Se realizó mediante la tinción de las estructuras fúngicas con azul de algodón, destinado para conservar la integridad de las mismas, permitiendo así la observación adecuada durante la identificación (López-Jácome *et al.*, 2014).

Para su tipificación por género, se tomó una muestra de cada colonia con el asa micológica y se realizó una preparación en fresco con azul de algodón. Concluida esta parte se observaron las estructuras en un microscopio óptico (OLYMPUS® modelo CH00RF100).



Figura 15. Identificación micromorfológica de las colonias obtenidas de la atmósfera del Valle de Toluca.

La identificación de los géneros fúngicos se efectuó bajo las claves taxonómicas de Barron (1968), Barnett y Hunter (1972) y Von Arx (1981).

8.5 Purificación en medio PDA

Para la purificación de los aislados de *Alternaria* se utilizó agar papa dextrosa natural (PDA) en cajas Petri de 4 cm de diámetro en una proporción: agar 15 g/L, dextrosa 20 g/L, papa natural 300 g/L; ya que este medio es altamente nutritivo, permitiendo así la esporulación y la producción de pigmentos en algunos dermatofitos (Frank *et al.*, 1993; Leslie *et al.*, 2006).

El aislamiento se realizó por transferencia repetida (Nakasone *et al.*, 2004; Cañedo y Ames, 2004), hasta obtener cultivos de *Alternaria* puros, durante este procedimiento los aislados se incubaron una semana y media a 28 °C. Mientras que para su conservación se mantuvieron en refrigeración a 4°C, mediante éste proceso se observó la morfología y el crecimiento radial de la colonia (Figura 16).

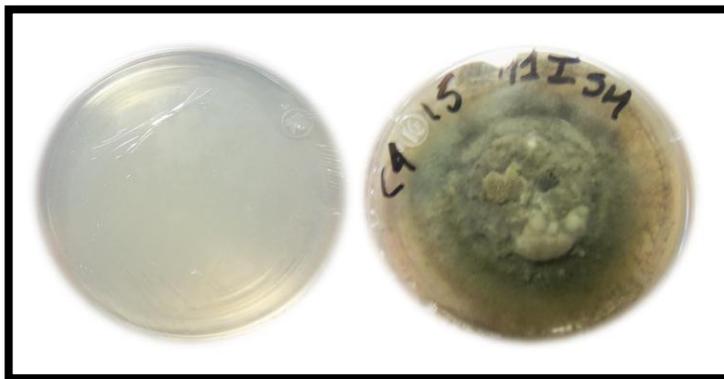


Figura 16. Cultivo de *Alternaria* en medio PDA.

8.6 Cálculos de propágulos/ml en cámara de Neubauer

Densidad:

$$\text{Densidad Total} = \sum \text{de los cuadrantes "B"} \times 5$$

Número de propágulos fúngicos:

$$\text{Propágulos totales} = \bar{X} * 1 \times 10^4$$

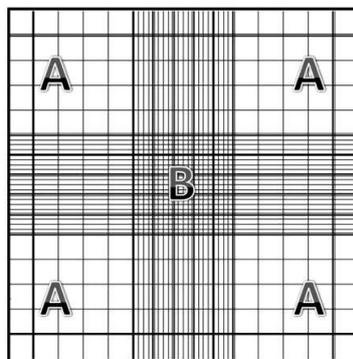


Figura 17. Cámara de Neubauer. Los cuadros con la letra (A) están subdivididos en 16 cuadros y el cuadro marcado con la letra (B) esta subdividido en 25 cuadros.

8.7 Determinación de actividad proteolítica

Conseguidos los aislados puros de *Alternaria*, se procedió a determinar la capacidad proteolítica del hongo mediante la degradación de la caseína con agar-leche descremada, en cajas Petri de 9 cm de diámetro a una proporción: leche descremada Svelty 20 g/L, agar 16 g/L, fosfato monobásico de sodio 27.8 g/L y fosfato dibásico de sodio 71.7 g/L. El interés de este medio; se debe a que, es el idóneo para la selección de microorganismos productores de proteasas (Bonifaz-Trujillo, 2012).

Ya obtenidos los medios; se hicieron 9 pozos a cada caja Petri con el revés de una pipeta Pasteur estéril, a continuación se realizaron raspados a todas las colonias puras de *Alternaria* en medio PDA adicionando 9 ml de Tween 80 al 0.05%. La suspensión resultante se depositó en tubos y se agito en un vortex durante 1 minuto con el propósito de homogenizar la suspensión de esporas (Figura 17), misma que se ajustó a una proporción de 1×10^4 con ayuda de la cámara de Neubauer. Finalizado esta etapa se depositó la suspensión de esporas a cada pozo y se incubaron a 28 °C.

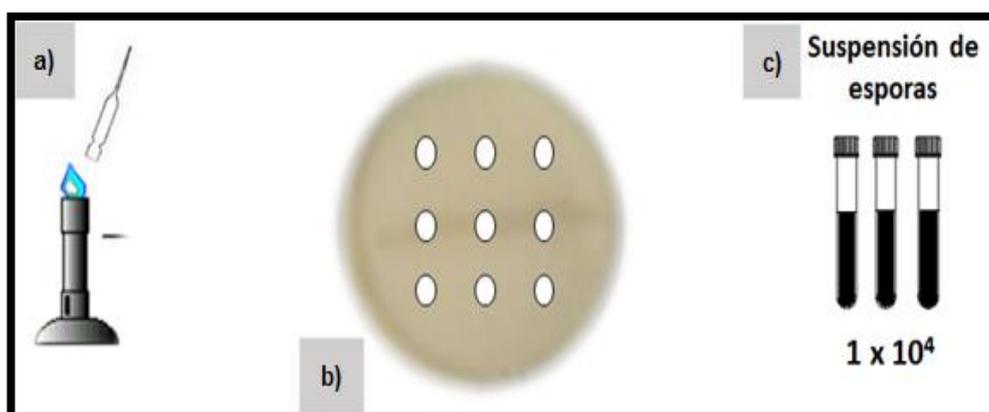


Figura 18. Procedimiento para la determinación de la actividad proteolítica.

Posteriormente, cada 24 horas se midieron los halos de las colonias durante 72 horas (Figura 18), ya que son las horas críticas en las que el patógeno logra parasitar al huésped; aunado a eso, se documentó por fotografía el crecimiento radial de las colonias por día. En cuanto a los datos obtenidos; se calculó el índice Enzimático de dichas cepas.

$$\text{Índice Enzimático: } \frac{\bar{x} \text{ halo}}{\bar{x} \text{ colonia}}$$

Al finalizar se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia de 0.05% en el programa estadístico JMP versión 8.0.

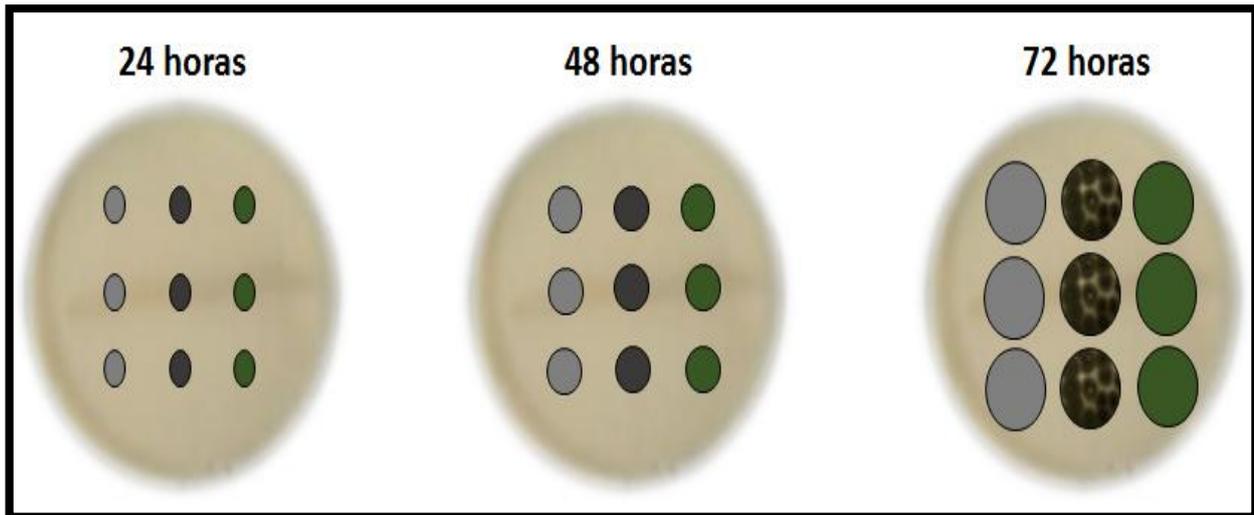


Figura 19. Esquema del crecimiento exponencial de las colonias y halos de *Alternaria* en agar-leche descremada.

8.8 Determinación de actividad queratinolítica

Este procedimiento se realizó en dos fases:

8.8.1 Agar de sales con plumas de ave triturada

Se utilizaron cajas Petri de 9 cm de diámetro con agar de sales y plumas de ave a una proporción: agar 23 g/L, plumas de ave trituradas al 2 g/L, cloruro de sodio 0.25 g/L, fosfato monobásico de potasio 0.375 g/L, carbonato de sodio 0.375 g/L y sulfato de magnesio 0.275 g/L.

Las plumas seleccionadas permanecieron una noche en extran para garantizar la remoción completa de los residuos que las plumas pudieran tener; posteriormente se dejaron remojando otra noche en agua destilada, transcurrido este tiempo se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 121°C (OMS, 2005). Una vez esterilizadas las plumas, se trituraron y se mezclaron con el agar de sales, para nuevamente llevarse a la autoclave. Obtenidos los medios, se hicieron 9 pozos a cada caja Petri con el revés de una pipeta Pasteur estéril (Figura 20).

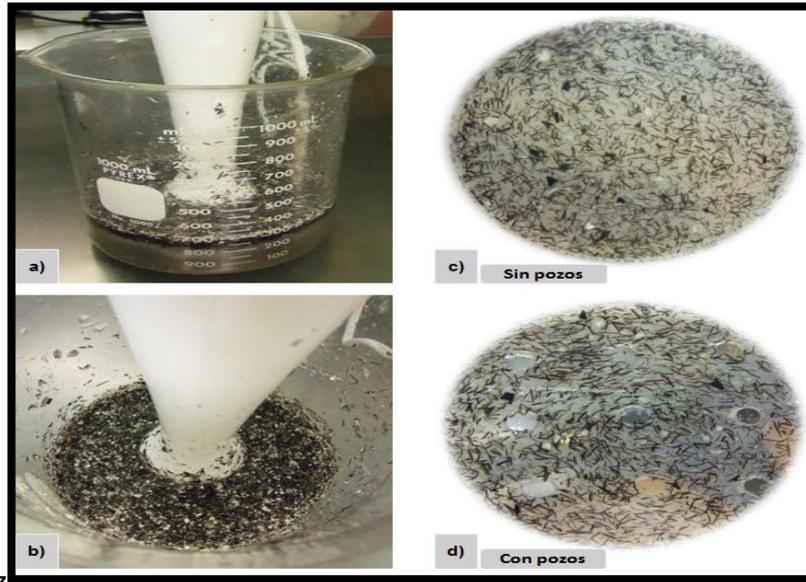


Figura 20. Procedimiento para la obtención del medio de sales con plumas de ave trituradas.

Finalmente se realizaron raspados a las colonias puras de *Alternaria* en medio PDA adicionando 9 ml de Tween 80 al 0.05%. La suspensión resultante se depositó en tubos y se agito en un vortex durante 1 minuto con el propósito de homogenizar la suspensión de esporas, misma que se ajustó a una proporción de 1×10^4 con ayuda de la cámara de Neubauer. Concluida esta etapa se depositó la suspensión de esporas a cada pozo y se incubaron a 28 °C.

Para este procedimiento; al igual que el de agar-leche descremada, se midieron los halos de las colonias durante 72 horas (Figura 18), se documentó por fotografía el crecimiento radial de las colonias por día y se calculó el índice enzimático de los aislados. Al terminar; nuevamente, se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia de 0.05% en el programa estadístico JMP versión 8.0 (Figura 21).

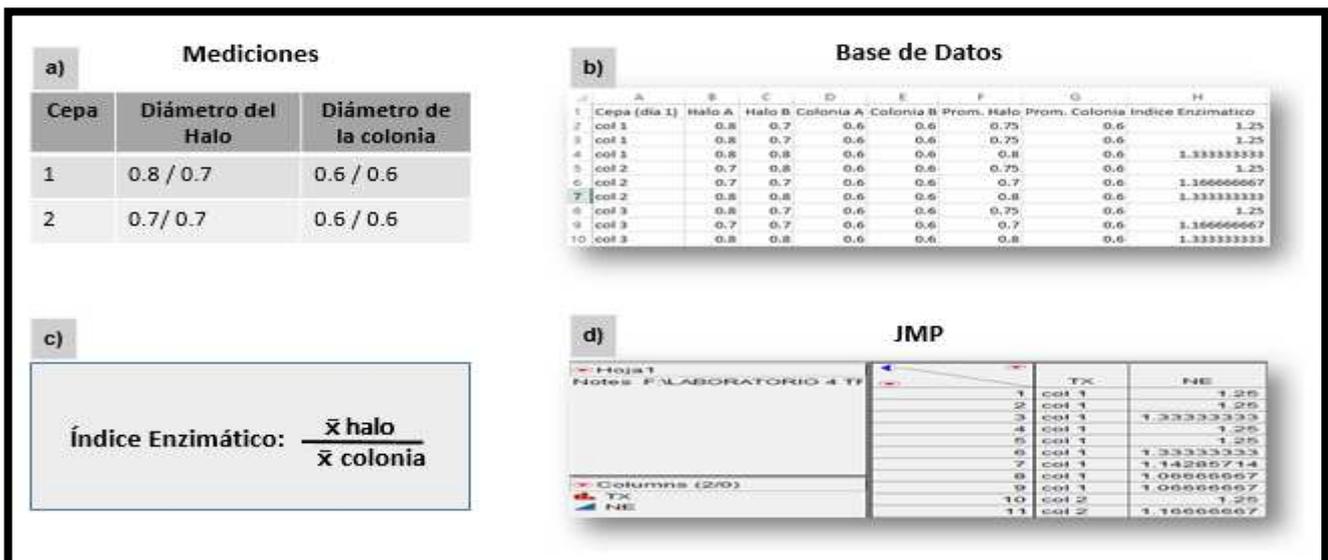


Figura 21. Análisis de los datos obtenidos por medición de halos.

8.8.2 Agar agua con plumas de ave

Se utilizaron cajas Petri de 9 cm de diámetro con agar agua y plumas de ave a una proporción: agar 16 g/L y plumas de ave de aproximadamente 1 cm. Las plumas seleccionadas al igual que en la procedimiento anterior permanecieron una noche en extran; otra noche se dejaron remojando en agua destilada y se esterilizaron en la autoclave durante 20 minutos a 121°C (OMS, 2005). Una vez esterilizadas las plumas, se cortaron a 1 cm y se esterilizaron nuevamente. Preparado el agar agua se depositaron 5 plumas por caja Petri (Figura 22) en campo estéril y se dejaron una noche en refrigeración a 4 °C, para descartar la contaminación de los mismos.

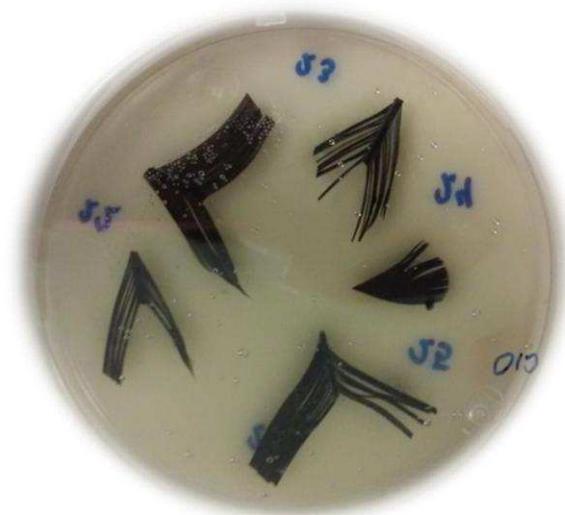


Figura 22. Medio agua con plumas de ave (1 cm de largo).

Verificado el anterior paso, se tomaron 4 µl de suspensión de esporas en Tween 80 al 0.05% obtenidas de los cultivos axénicos en PDA (ajustadas a 1×10^4). Las esporas fueron sembradas en 3 puntos específicos sobre la pluma, de manera que utilizaran el material queratinoso como única fuente de carbono y nitrógeno (Song, 2005). Al finalizar este procedimiento se realizaron observaciones diarias para el registro del índice de crecimiento y desarrollo fúngico (ICDF; Tabla 5), así como por documentación fotográfica.

Parámetro	Descripción
0.0	Fragmento de sustrato rodeado de conidios no germinados.
0.5	Germinación de conidios con uno o dos tubos germinales en el área cercana al sustrato.
1.0	Crecimiento de tubos germinales y presencia de hifas.
1.5	Crecimiento inicial de hongo orientado hacia el sustrato queratinoso y primer contacto de las hifas con él.
2.0	Crecimiento micelial en la superficie del sustrato.
2.5	Inicio de la esporulación, conidios que cubren el sustrato.
3.0	Esporulación completa, sustrato cubierto de micelio y conidios.

Tabla 5. Índice de Crecimiento y Desarrollo Fúngico (ICDF) modificado de Castellanos-Moguel *et al.*, 2013.

8.9 Análisis Estadístico

Las variables consideradas dentro de este estudio fueron temperatura del ambiente, humedad relativa, dirección y velocidad del viento; proporcionados por la Red Automática de Monitoreo Atmosférico del Valle de Toluca (*RAMAT*). Por lo que se realizó un análisis descriptivo utilizando el coeficiente de correlación de Pearson entre *Alternaria* presente en la atmósfera y los parámetros ambientales evaluando el grado de asociación entre las variables aleatorias cuantitativas. El Coeficiente de correlación de Pearson se representa usualmente con la letra “r” y se obtiene tipificando el promedio de los productos de las puntuaciones diferenciales de cada caso en las dos variables correlacionadas.

Para el análisis de abundancia (UFC) y de frecuencias (%) se tomó en consideración las estaciones de monitoreo, épocas anuales y la presencia-ausencia de *Alternaria* y otros géneros alérgenos o patógenos.

Mientras que para los datos obtenidos del crecimiento de las colonias y sus halos, se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis utilizando el programa estadístico JMP versión 8, con el fin de establecer diferencias estadísticas significativas entre el nivel enzimático de los aislados de *Alternaria*, tanto para el ensayo con agar-leche descremada como para el agar de sales con plumas de ave trituradas.

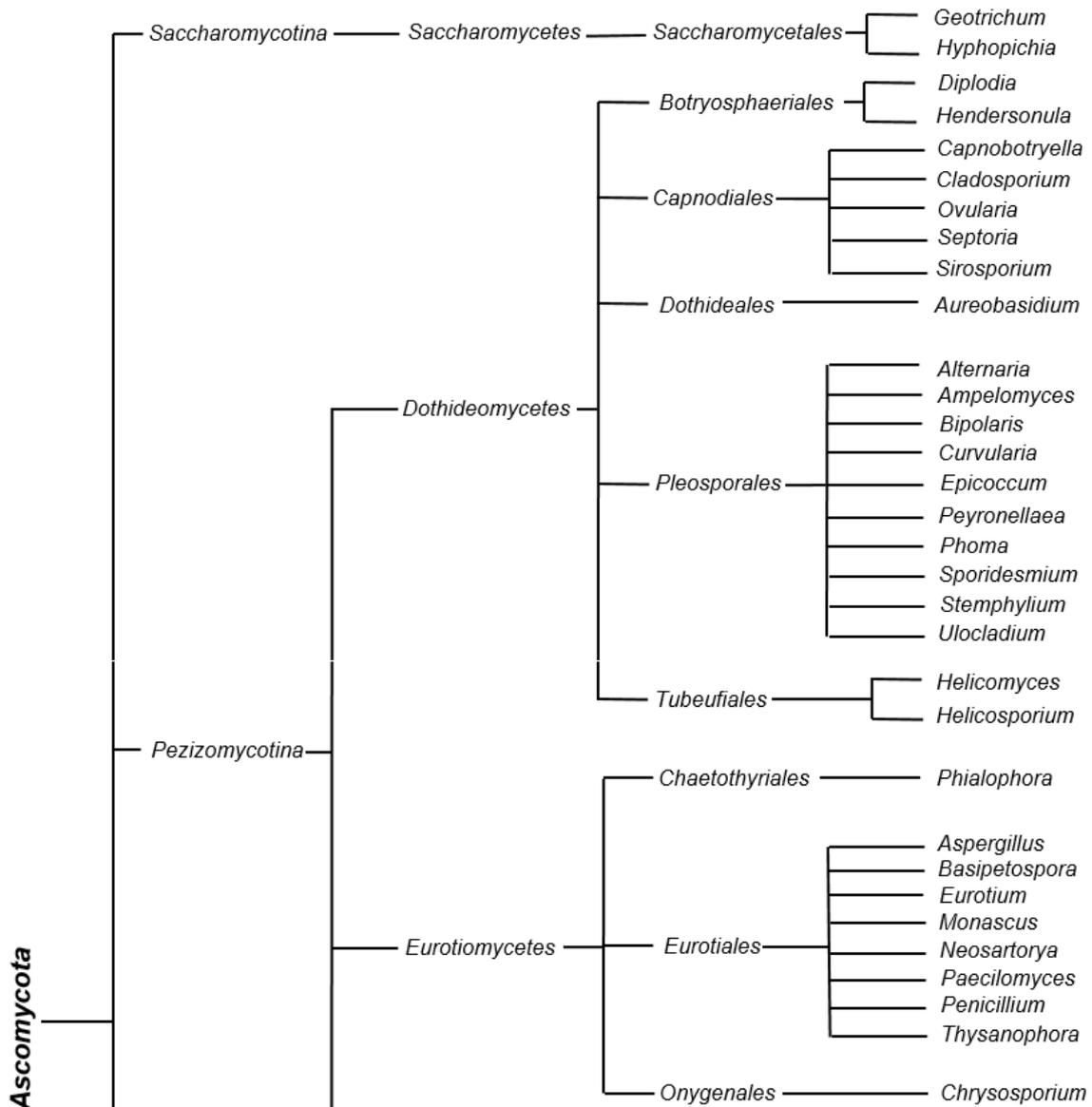
En cuanto al ensayo en agar agua con plumas de ave, se analizó mediante el Índice de Crecimiento y Desarrollo Fúngico (ICDF; Landa *et al.*, 1994), ligeramente modificado de Castellanos-Moguel *et al.*, 2013 para determinar la patogenicidad de los aislados estudiados.

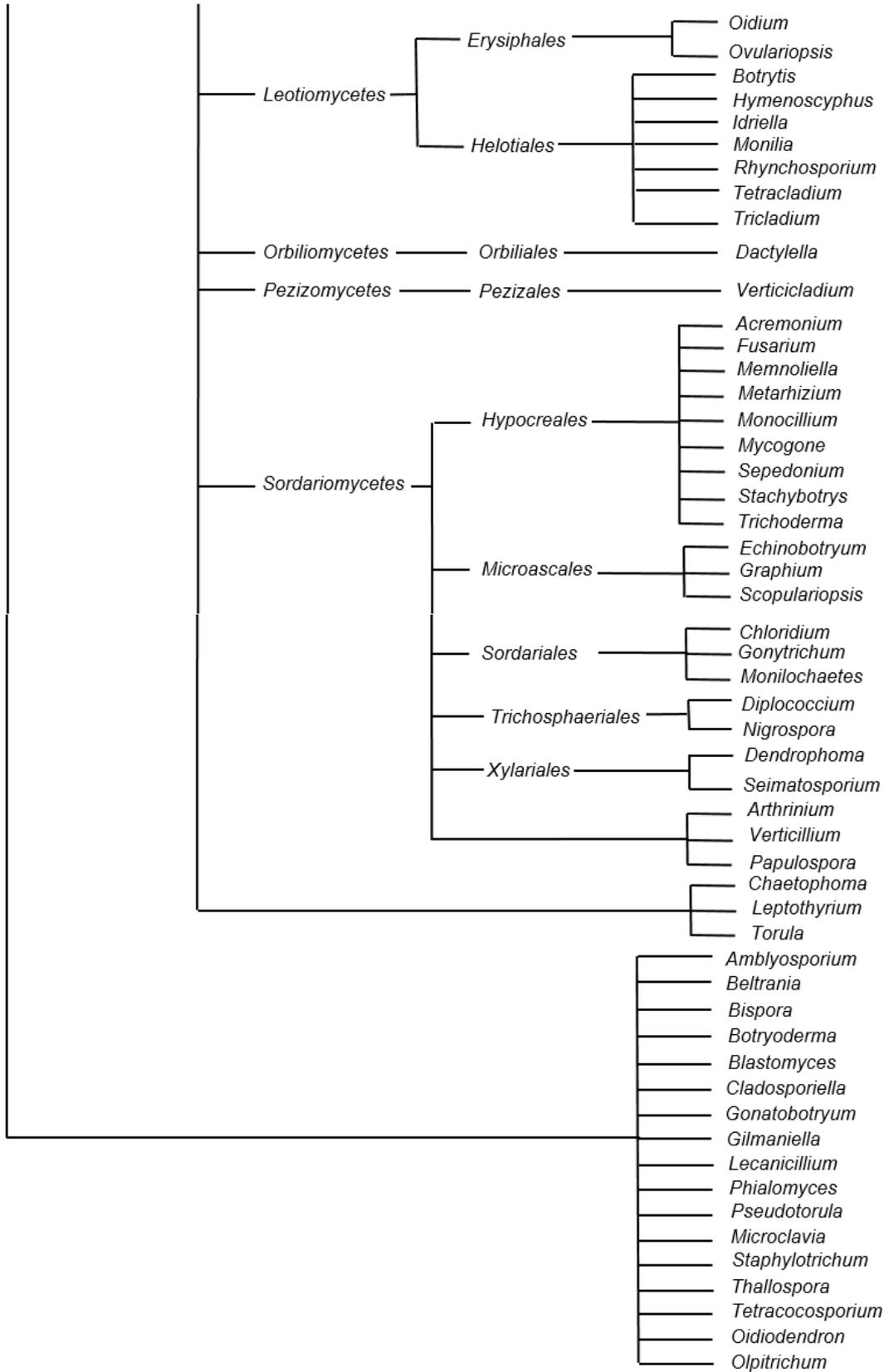
9. Resultados

9.1 Clasificación taxonómica de los géneros encontrados en el Valle de Toluca

Durante el muestreo se encontró un total de 102 géneros fúngicos, los cuales se clasificaron utilizando la base de datos MycoBank (International Mycological Association, 2016), basada en el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN) en el siguiente orden:

- ❖ Filum
- ❖ Sub Filum
- ❖ Clase
- ❖ Orden
- ❖ Familia
- ❖ Género





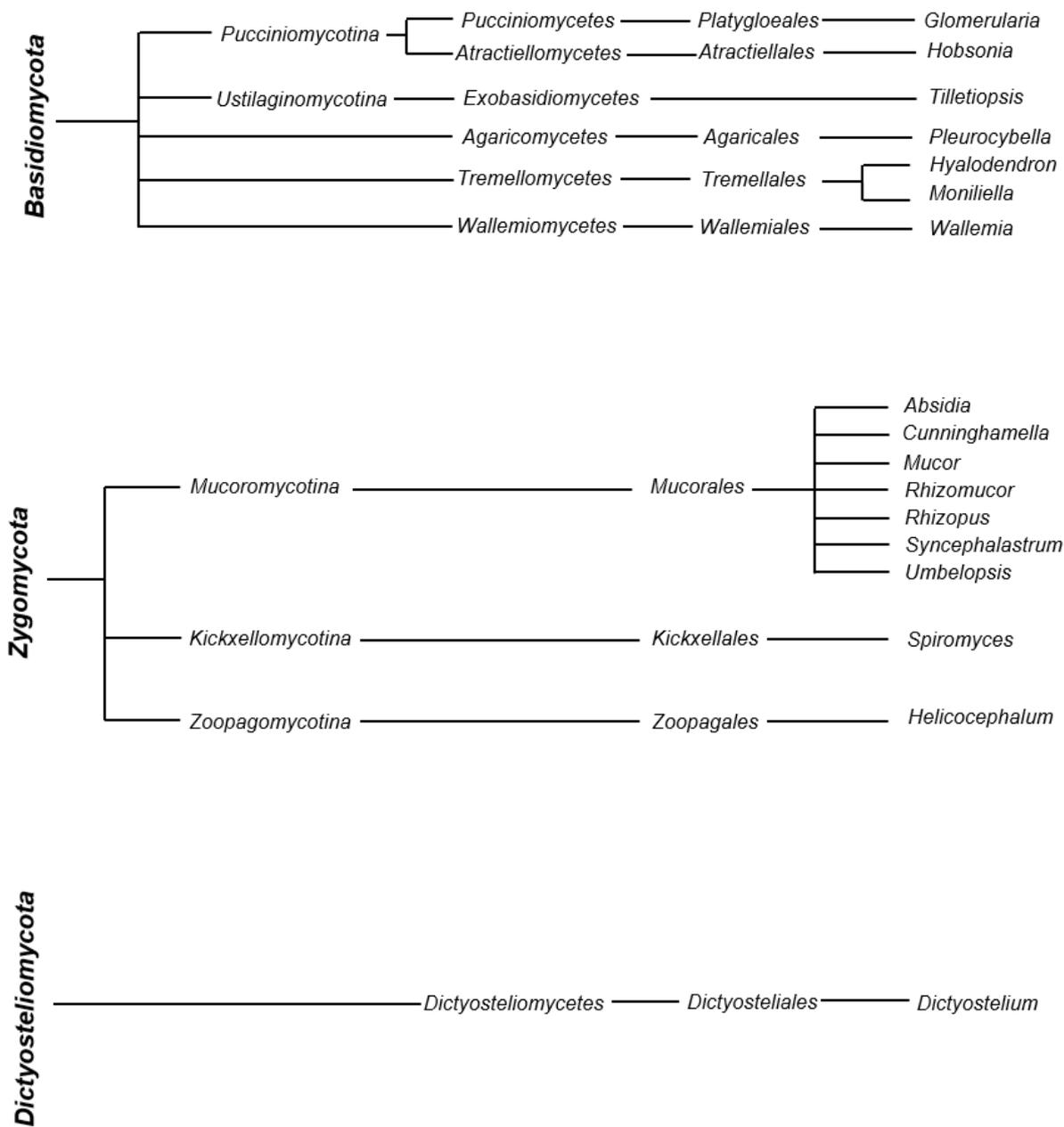


Figura 23. Clasificación taxonómica de géneros fúngicos encontrados en el Valle de Toluca.

9.2 Abundancia y diversidad de géneros encontrados en el Valle de Toluca

Del conteo total del muestreo en UFC se registró la cantidad de 5146 UFC en el Valle de Toluca. Mientras que los géneros más abundantes fueron *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* y *Alternaria* (Figura 24). Considerados como altamente alérgenos, patógenos de plantas, y oportunistas en animales y humanos.

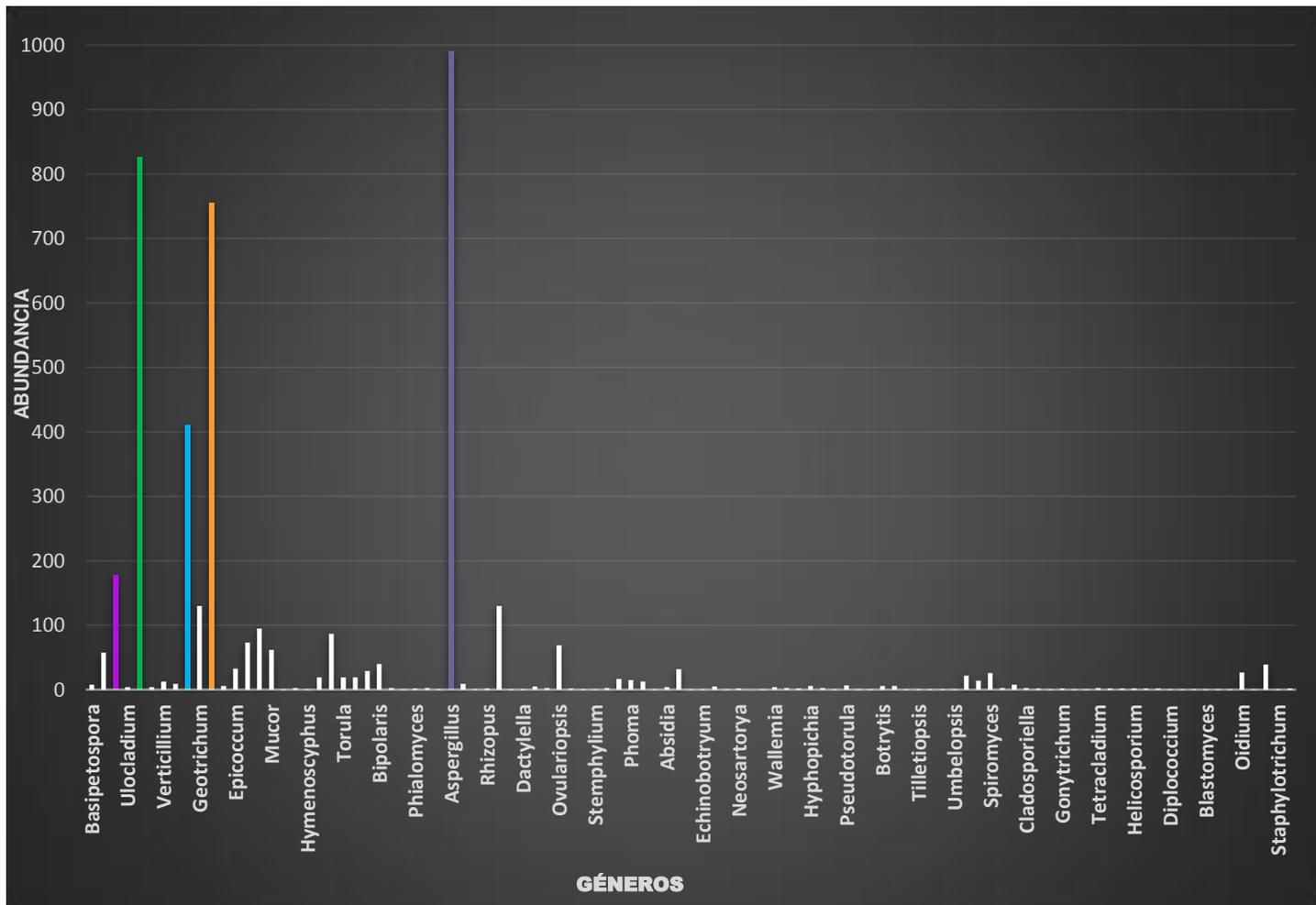


Figura 24. Grafica representativa de la abundancia y diversidad de los géneros encontrados durante el muestreo de 2014-2015.

Los porcentajes correspondientes a los cinco géneros más abundantes durante todo el muestreo son los siguientes: *Aspergillus* 22%, *Penicillium* 19%, *Cladosporium* 17%, *Fusarium* 9% y *Alternaria* 4%. Equivalentes al 71% de la abundancia total del muestreo, mientras que los géneros restantes mostraron ser una minoría con un 29% (Figura 25).

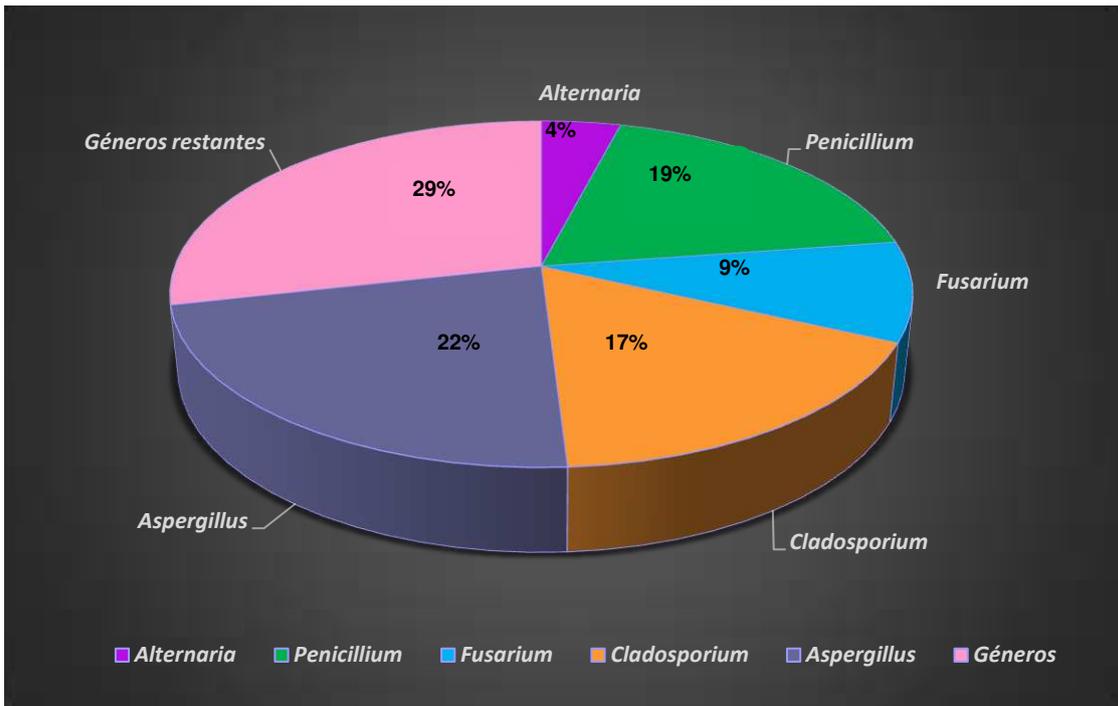


Figura 25. Grafica en porcentaje de los géneros más abundantes contrastado con el resto de los demás géneros encontrados durante el muestreo de 2014-2015.

Sin embargo, algunos géneros pertenecientes a esa minoría están considerados como alérgenos potenciales, tal es el caso de *Absidia*, *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Bipolaris*, *Blastomyces*, *Botrytis*, *Chrysosporium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Phialophora*, *Phoma*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* y *Ulocladium*. En cuanto a los hongos altamente patógenos, encontramos a *Absidia*, *Chrysosporium*, *Cunninghamella*, *Mucor*, *Monilia*, *Phialophora*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Syncephalastrum* y *Umbelopsis*.

Aunado a lo anterior, es importante mencionar que algunas colonias no mostraron estructuras reproductoras con las cuales ser identificadas; por lo que se reportaron como *Micelio Estéril* con un 42% del total del muestreo. Igualmente se contabilizaron algunas colonias con morfología ovoide o elíptica, de color blanquecino a beige brillante, características de las *Levaduras* (37%); así como la presencia de algunas estructuras identificadas como *Picnidios* (19%), *Dematiáceos* (1%) y *Artrosporas* (1%). Cabe destacar que durante el muestreo no se registró presencia de *bacterias* que pudieran interferir con el crecimiento y desarrollo de los microorganismos.

9.3 Morfología de los géneros más abundantes

A continuación una breve descripción de los géneros más abundantes, basado en la macro y micromorfología observada en el microscopio óptico (OLYMPUS©) del laboratorio de Micología de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco (UAM-X).

Aspergillus sp.

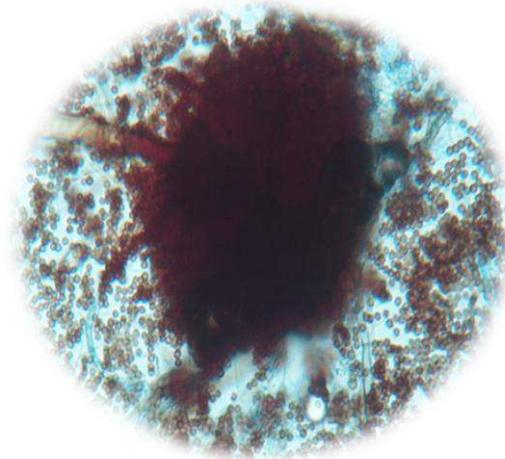


Figura 26. Micromorfología de *Aspergillus sp.*

Hongo filamentoso hialino ligeramente verdoso sin septos con ramificaciones en el conidióforo, ensanchado al final por una vesícula amplia, coronada de esterigmas en forma de redoma. Tiene conidios verdes oscuros, unicelulares redondos que forman una cadena. Sus colonias son de color verde oscuro y en ocasiones cuenta con bordes blanquecinos.

Penicillium sp.

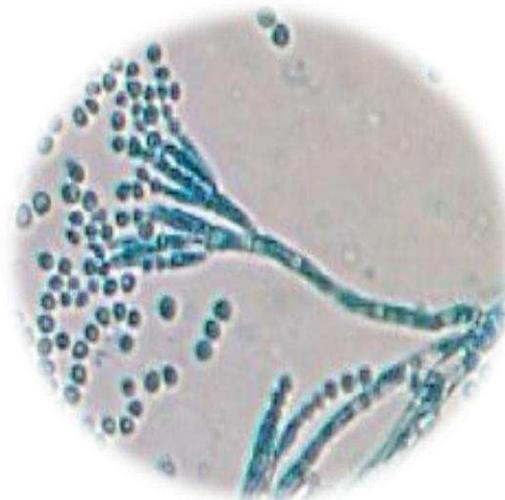


Figura 27. Micromorfología de *Penicillium sp.*

Hongo polvoso de color verde olivo con blanco, que cuenta con hifas septadas. Posee un conidióforo derivado del micelio, con un solo verticilio en la fiálide formando cadenas de conidios esféricos de color verde azulado.

Cladosporium sp.

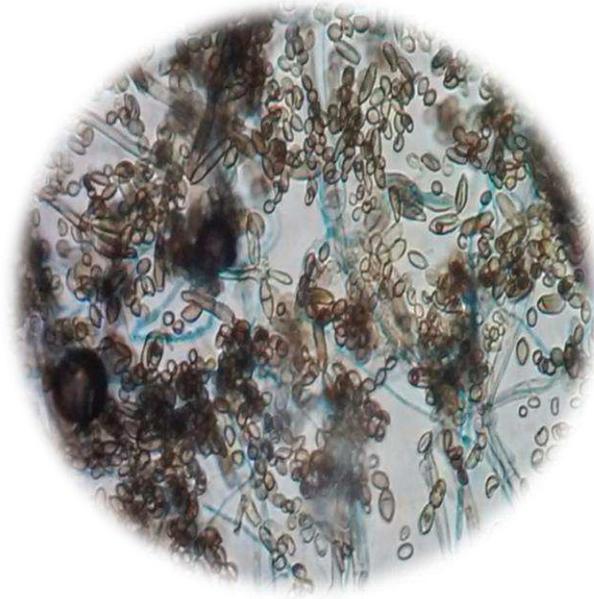


Figura 28. Micromorfología de *Cladosporium sp.*

Hongo filamentoso, perteneciente al grupo de los dematiáceos, caracterizado por presentar una coloración oscura. Cuenta con hifas septadas pigmentadas. Las hifas sostienen cadenas ramificadas de conidios elipsoides o cilíndricos de color marrón.

Fusarium sp.



Figura 29. Micromorfología de *Fusarium sp.*

Hongo hialino con macro y microconidios unidos a la fiálide. Los macroconidios cuentan con una célula apical alargada con forma de hoz. Mientras que los microconidios tienen 1 o 2 células ovoides. Sus colonias son de color blanco, amarillo o rosado tenue.

Alternaria sp.

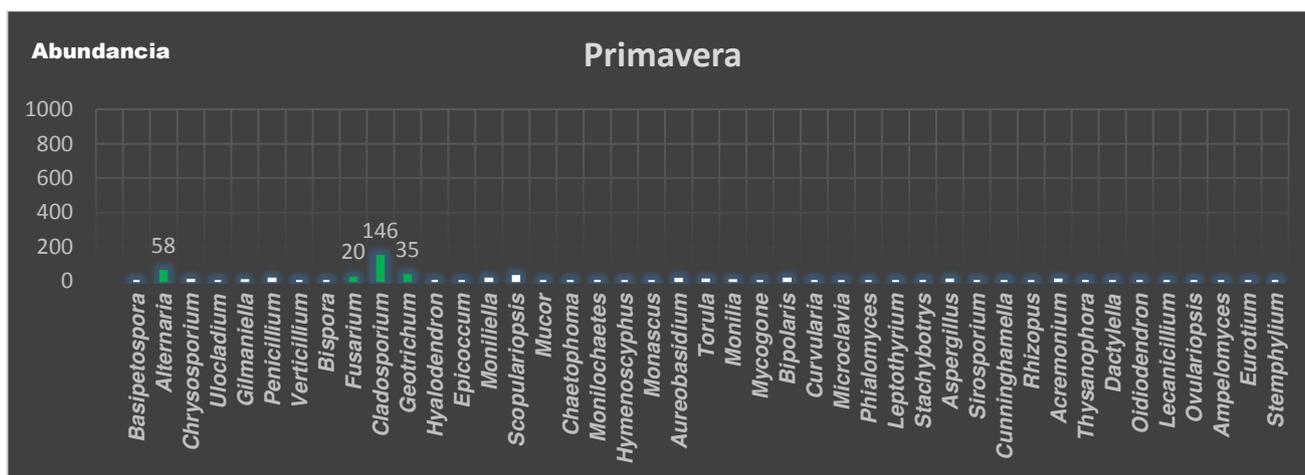


Figura 30. Micromorfología de *Alternaria sp.*

Hongo mohoso cosmopolita, que cuenta con conidios multicelulares con septos transversales y longitudinales irregulares de color marrón. Sus colonias son de color verde olivo o grisáceo, con consistencia polvorienta y lanosa.

9.4 Variación estacional de las esporas aerotransportadas

Se realizó un análisis de abundancia por estación para observar patrones de conducta de los géneros fúngicos encontrados.



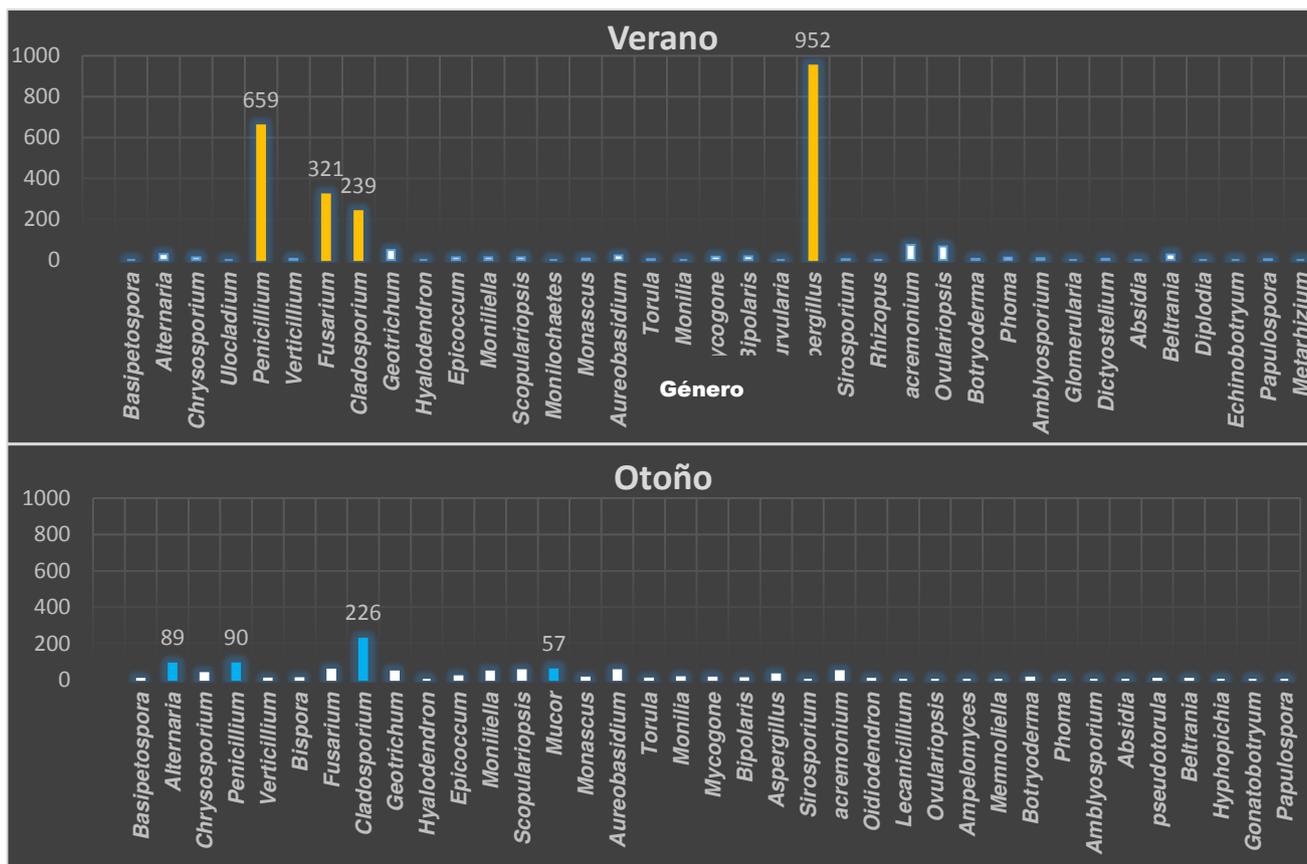


Figura 31. Variación estacional de los géneros encontrados durante el muestreo 2014-2015.

Durante el estudio se realizaron 21 muestreos abarcando las cuatro estaciones del año (Tabla 6).

Estaciones anuales	Muestreos
Primavera	M1-I, M2-I, M2-F, M3-I, M3-F, M4-I, M4-F, M5-I, M5-F.
Verano	M6-I, M6-F, M7-I, M7-F, M8-I, M8-F, M9-I, M9-F, M11-I, M11-F, M12-I, M12-F.
Otoño	M13-I, M13-F, M14-I, M14-F, M15-I, M15-F, M16-I, M17-I, M17-F, M18-I, M18-F.
Invierno	M19-I, M20-I, M21-I.

Tabla 6. Muestreos correspondientes a las estaciones anuales. La letra (M) representa la abreviatura de la palabra "Muestreo". El número siguiente, simboliza el número del muestreo. Finalmente la letra después del guion significa la fase en la que se llevaron a cabo, Impactación directa (I) o por toma de Filtros (F).

Durante el estudio, tres muestreos no mostraron presencia de estructuras fungicas; tal es el caso del muestro no. 1 de Filtros (M1-F) en primavera, el muestreo no. 10 de Impactación y de Filtros (M10-I y M10-F) en verano y el muestreo no. 16 de Filtros (M16-F) en otroño. En cuanto a invierno, no se muestreó cada 15 días como en las otras temporalidades, ni tampoco se tomaron muestras con filtros; únicamente se muestrearon los días 4 y 9 de Enero de 2015, así como el 26 de Diciembre de 2014. Debido a que fueron los días más cercanos a las festividades realizadas en época de Sembrina y de Día de Reyes.

En cuanto a la diversidad de géneros encontrados durante las estaciones muestreadas, se puede apreciar que existan fluctuaciones notorias entre cada una de ellas (Figura 31). Siendo verano la estación en la que se presentó una mayor cantidad de géneros con 34%, seguido de otoño con 33%, primavera con 27% e invierno únicamente con 6% (Figura 32). Este mismo patrón se repite pero en UFC (Figura 32), siendo nuevamente verano cuando se obtuvo una mayor cantidad con 2737 UFC correspondiente al 62%, seguido de otoño con 1016 UFC (23%), primavera con 432 UFC (10%) e invierno con 242 UFC (5%).

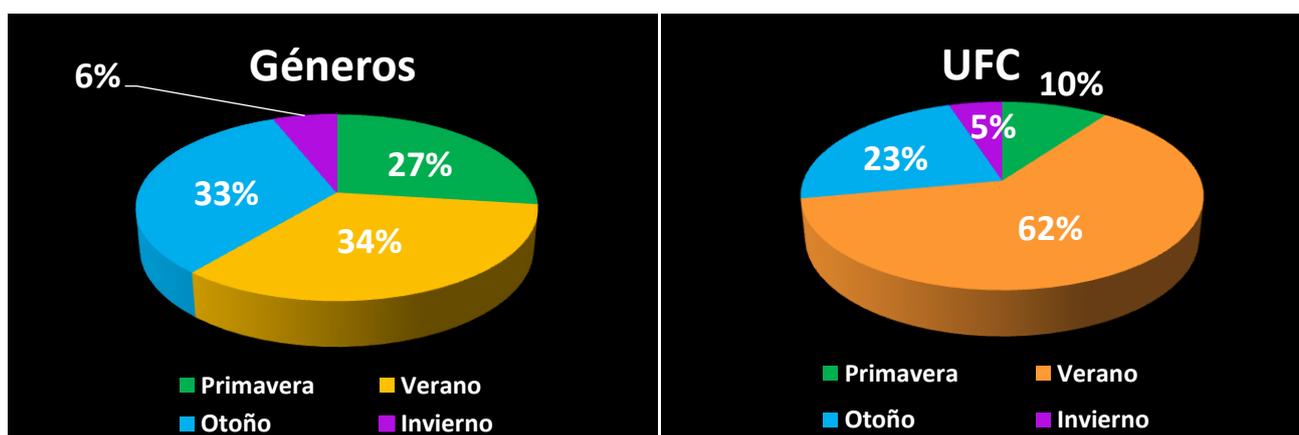


Figura 32. Graficas en porcentaje de la cantidad de géneros y UFC presentes en las estaciones anuales durante el muestreo de 2014-2015.

En seguida se presenta en la Tabla 7, los géneros con mayor cantidad de UFC por estaciones anuales.

Primavera	<i>Cladosporium, Alternaria, Geotrichum y Fusarium.</i>
Verano	<i>Aspergillus, Penicillium, Fusarium y Cladosporium.</i>
Otoño	<i>Cladosporium, Penicillium, Alternaria y Mucor.</i>
Invierno	<i>Cladosporium, Penicillium, Fusarium y Oidium.</i>

Tabla 7. Géneros con mayor cantidad de UFC en las cuatro estaciones anuales durante el muestreo 2014-2015 en el Valle de Toluca.

Mientras que los géneros que se encontraron una vez durante el muestreo (Tabla 8) fueron:

<i>Arthrinium</i>	<i>Blastomyces</i>	<i>Cladosporiella</i>	<i>Chaetophoma</i>	<i>Cunninghamella</i>
<i>Chloridium</i>	<i>Dactylella</i>	<i>Dictyostelium</i>	<i>Diplodia</i>	<i>Dendrophoma</i>
<i>Diplococcium</i>	<i>Eurotium</i>	<i>Echinobotryum</i>	<i>Gilmaniella</i>	<i>Gonytrichum</i>
<i>Gonatobotryum</i>	<i>Glomerularia</i>	<i>Helicocephalum</i>	<i>Helicosporium</i>	<i>Helicomycetes</i>
<i>Hendersonula</i>	<i>Hymenoscyphus</i>	<i>Hobsonia</i>	<i>Idriella</i>	<i>Leptothyrium</i>
<i>Metarhizium</i>	<i>Microclavia</i>	<i>Neosartorya</i>	<i>Olpitrichum</i>	<i>Ovularia</i>
<i>Phialophora</i>	<i>Phialomyces</i>	<i>Pleurocybella</i>	<i>Rhizomucor</i>	<i>Rhynchosporium</i>
<i>Seimatosporum</i>	<i>Septoria</i>	<i>Stachybotrys</i>	<i>Staphylotrichum</i>	<i>Stemphylium</i>

<i>Spiromyces</i>	<i>Sporidesmium</i>	<i>Syncephalastrum</i>	<i>Tetracladium</i>	<i>Tetracosporium</i>
<i>Tricladium</i>	<i>Thysanophora</i>	<i>Tilletiopsis</i>	<i>Thallospora</i>	<i>Umbelopsis</i>
<i>Verticicladium</i>	<i>Wallemia</i>			

Tabla 8. Géneros encontrados una solo ocasión durante el muestreo 2014-2015 en el Valle de Toluca.

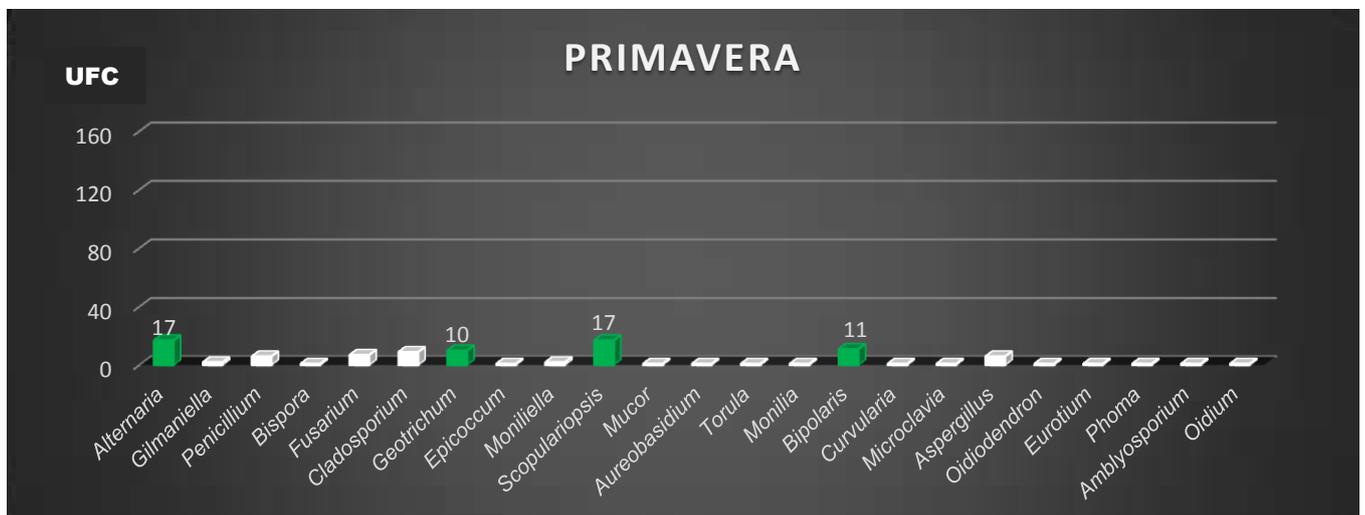
Resulta importante mencionar que los géneros más abundantes y también gran parte de los que obtuvieron una mayor cantidad de UFC, son también aquellos que se presentaron durante las cuatro estaciones anuales, los cuales fueron *Aureobasidium*, *Alternaria*, *Apergillus*, *Cladosporium*, *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Oidium* y *Penicillium* (Figura 31).

9.5 Variación de las esporas aerotransportadas por estaciones de monitoreo

En lo concerniente a las estaciones de monitoreo se puede observar entre cada una de ellas variaciones respecto a la carga de bioaerosoles expresada en UFC, así como la presencia de mayor cantidad de géneros en unas épocas que en otras. Es necesario añadir que los muestreos correspondientes a la época de invierno no se consideraron para este apartado, ya que las cajas Petri utilizadas en esa época solo se colocaron en una estación de monitoreo y no siempre fue en la misma debido a cuestiones de tiempo y festividades; por lo que las comparativas solo se realizaran entre las épocas de primavera, verano y otoño por estaciones de monitoreo (San Cristóbal, Aeropuerto, Oxtotitlán y San Mateo).

9.5.1 Estación de Monitoreo San Cristóbal

En las estaciones primavera, verano y otoño se pueden observar cierta heterogeneidad entre cada una de ellas (Figura 33); con relación a la cantidad de UFC y géneros presentes. Donde otoño mostró tener una mayor cantidad de géneros fúngicos con 36, seguido de verano con 35 géneros, mientras que primavera solo obtuvo 23 géneros. Respecto a las UFC los papeles se invirtieron siendo verano el que consiguió la mayor cantidad con 430 UFC, seguido de otoño con 294 UFC y primavera con 100 UFC.



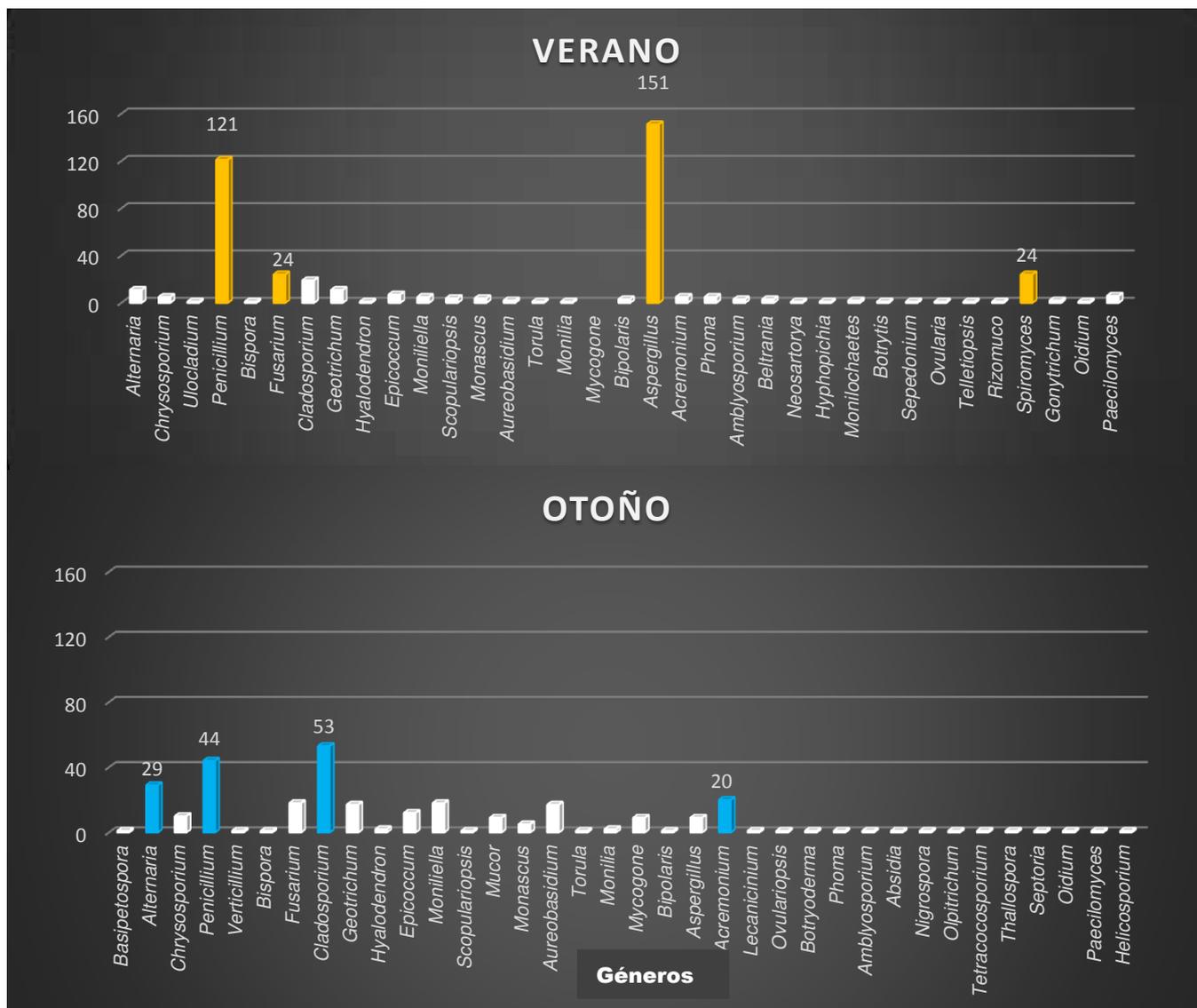


Figura 33. Variación estacional de los géneros encontrados en la estación de monitoreo en San Cristóbal, municipio de Toluca.

En la siguiente Tabla (9) se presentan los géneros más abundantes en UFC por estaciones anuales en San Cristóbal.

Primavera	<i>Scopulariopsis, Alternaria, Geotrichum y Bipolaris.</i>
Verano	<i>Aspergillus, Penicillium, Fusarium y Spiromyces.</i>
Otoño	<i>Cladosporium, Penicillium, Alternaria y Acremonium.</i>

Tabla 9. Géneros con mayor cantidad de UFC en las épocas de primavera, verano y otoño durante el muestreo 2014-2015 en el Valle de Toluca.

9.5.2 Estación de Monitoreo Aeropuerto

En lo respectivo a la estación de monitoreo Aeropuerto, la situación es similar a la descrita anteriormente con San Cristóbal; ya que otoño nuevamente mostró tener una mayor

cantidad de géneros fúngicos con 37, seguido de verano con 30 géneros y primavera 27. De igual manera en cuanto a las UFC, verano consiguió la mayor cantidad con 715 UFC, seguido de otoño con 259 UFC y primavera con 187 UFC (Figura 34).

A continuación en la siguiente Tabla (10) se presentan los géneros más abundantes en UFC por estaciones anuales en Aeropuerto.

Primavera	<i>Cladosporium, Alternaria y Acremonium.</i>
Verano	<i>Aspergillus, Penicillium, Fusarium y Acremonium.</i>
Otoño	<i>Cladosporium, Alternaria Mucor y Aureobasidium.</i>

Tabla 10. Géneros con mayor cantidad de UFC en las épocas de primavera, verano y otoño durante el muestreo 2014-2015 en el Valle de Toluca.

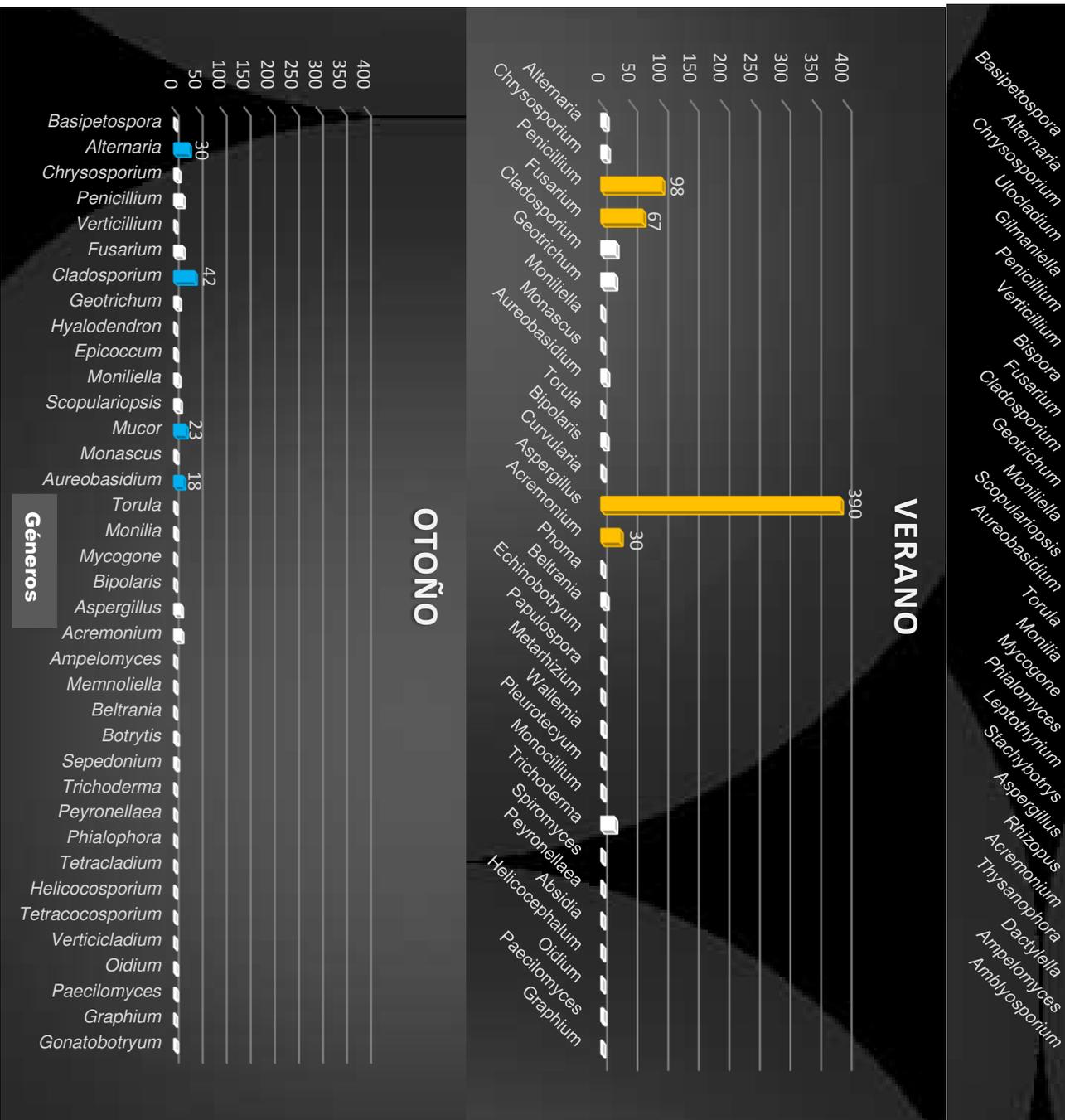
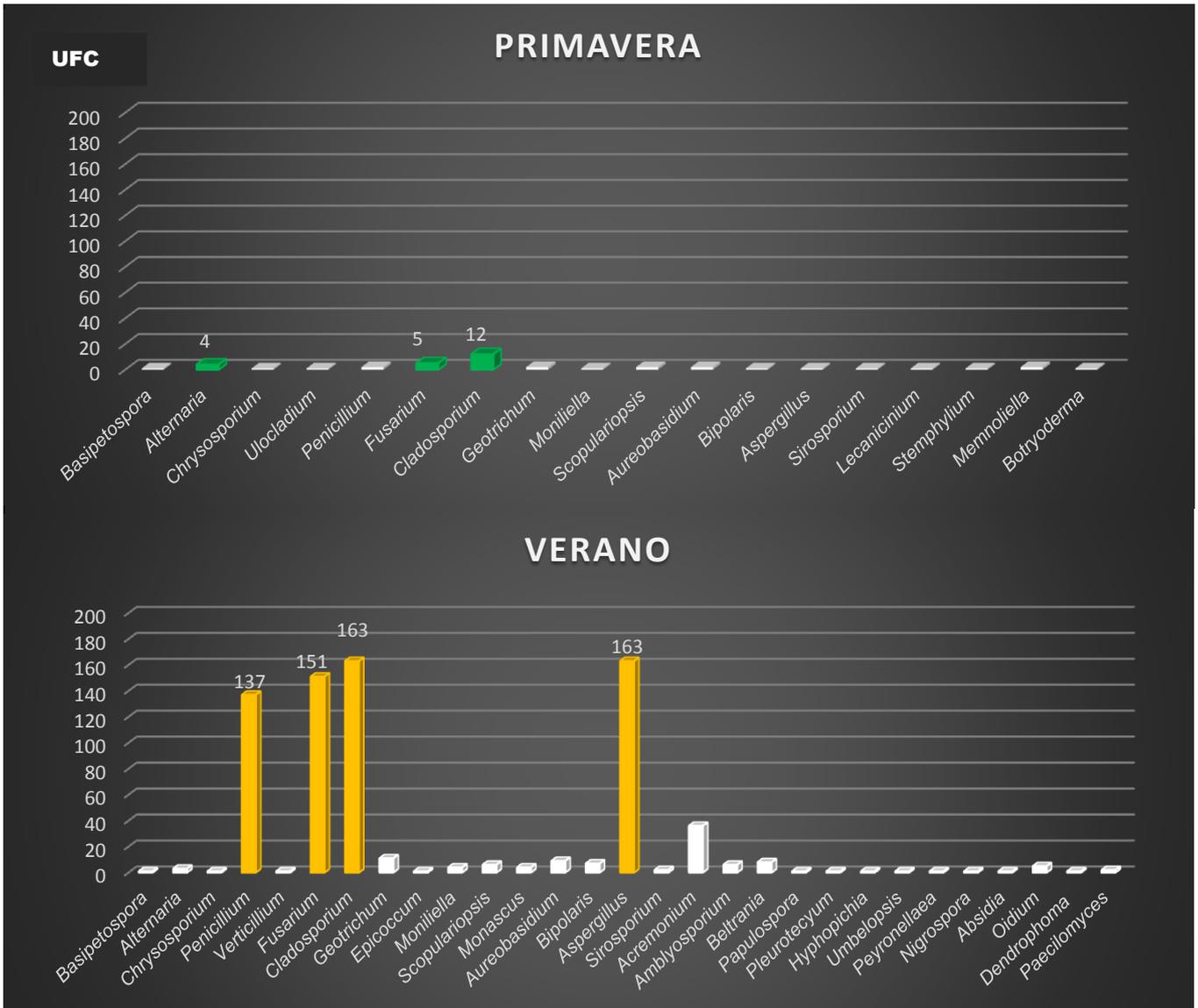


Figura 34. Variación estacional de los géneros encontrados en la estación de monitoreo en Aeropuerto, municipio de Toluca.

9.5.3 Estación de Monitoreo Oxtotitlán

La estación de monitoreo Oxtotitlán, de igual manera que las dos estaciones de monitoreo antes mencionadas sigue el mismo patrón. Otoño reiteradamente mostró tener una mayor cantidad de géneros fúngicos con 32, seguido de verano con 29 géneros, mientras que primavera solo presento 18 géneros. Referente a las UFC, verano consiguió la mayor cantidad con 729 UFC, seguido de otoño con 162 UFC y primavera con 41 UFC (Figura 35).



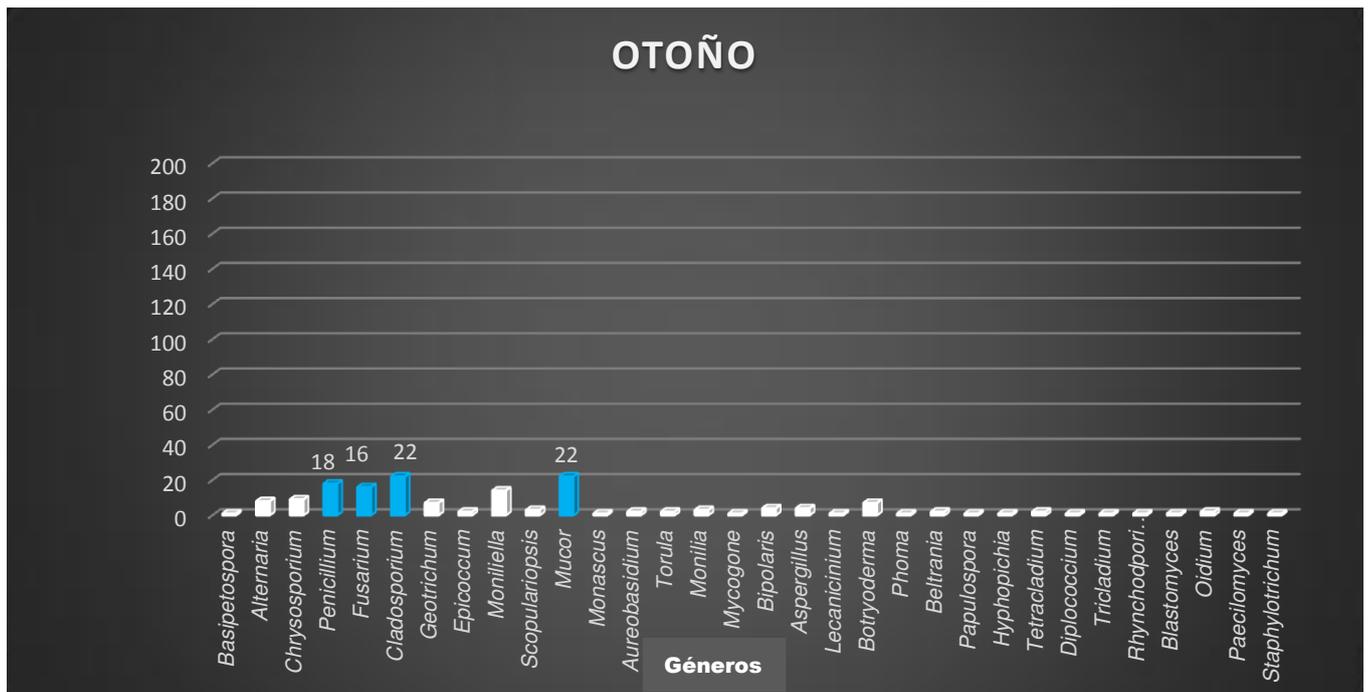


Figura 35. Variación estacional de los géneros encontrados en la estación de monitoreo en Oxtotitlán, municipio de Toluca.

En la siguiente Tabla (11) se presentan los géneros más abundantes en UFC por estaciones anuales en Oxtotitlán.

Primavera	<i>Cladosporium, Fusarium y Alternaria.</i>
Verano	<i>Cladosporium, Aspergillus, Fusarium y Penicillium.</i>
Otoño	<i>Cladosporium, Mucor, Penicillium y Fusarium.</i>

Tabla 11. Géneros con mayor cantidad de UFC en las épocas de primavera, verano y otoño durante el muestreo 2014-2015 en el Valle de Toluca.

9.5.4 Estación de Monitoreo San Mateo

Finalmente en la estación de monitoreo San Mateo, algo inusual se suscitó, ya que en el caso particular de esta estación; verano mostró la mayor cantidad de géneros con 34, seguido de otoño con 33 y primavera con 23 géneros. Mientras que para las UFC la secuencia fue igual a las anteriores, verano con 774 UFC, seguido de otoño con 280 UFC y primavera con 101 UFC (Figura 36).

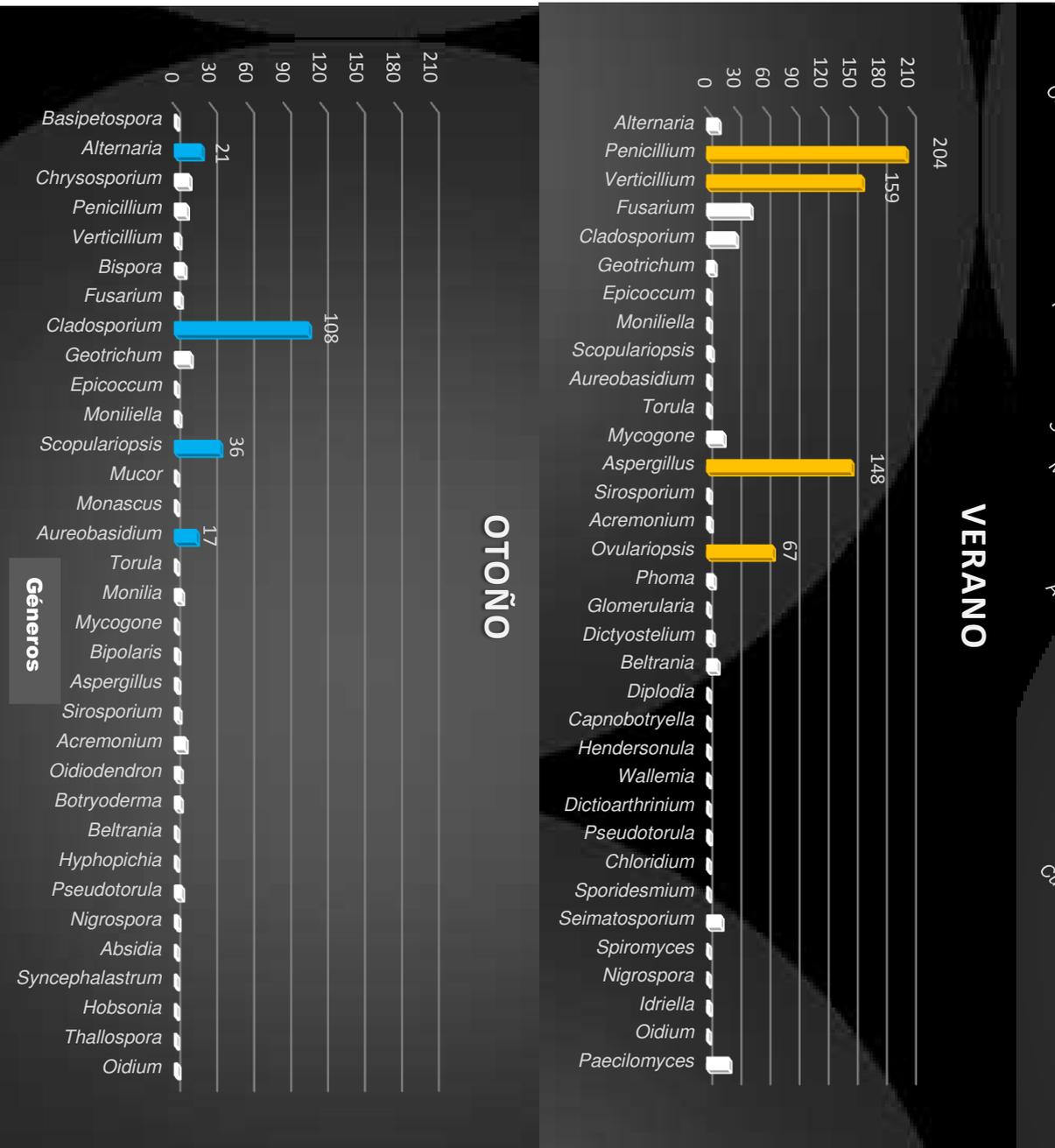


Figura 36. Variación estacional de los géneros encontrados en la estación de monitoreo en San Mateo, municipio de Toluca.

Enseguida se presenta en la siguiente Tabla (12) los géneros más abundantes en UFC por estaciones anuales en San Mateo.

Primavera	<i>Cladosporium, Alternaria y Geotrichum.</i>
Verano	<i>Penicillium, Verticillium, Aspergillus y Ovulariopsis.</i>
Otoño	<i>Cladosporium, Scopulariopsis, Alternaria y Aureobasidium.</i>

Tabla 12. Géneros con mayor cantidad de UFC en las épocas de primavera, verano y otoño durante el muestreo 2014-2015 en el Valle de Toluca.

9.6 Abundancia de *Alternaria* por épocas anuales y estaciones de Monitoreo

Alternaria es considerado uno de los géneros más relevantes a nivel mundial. Característico por estar presente durante las cuatro épocas del año, como se muestra en la Figura 37, en la que se aprecia la presencia de este género en todas las temporalidades. De igual manera se puede observar que el mayor porcentaje de UFC se encontró en otoño con 50%, seguido de primavera con 33%, verano con 16% e invierno con 1%.

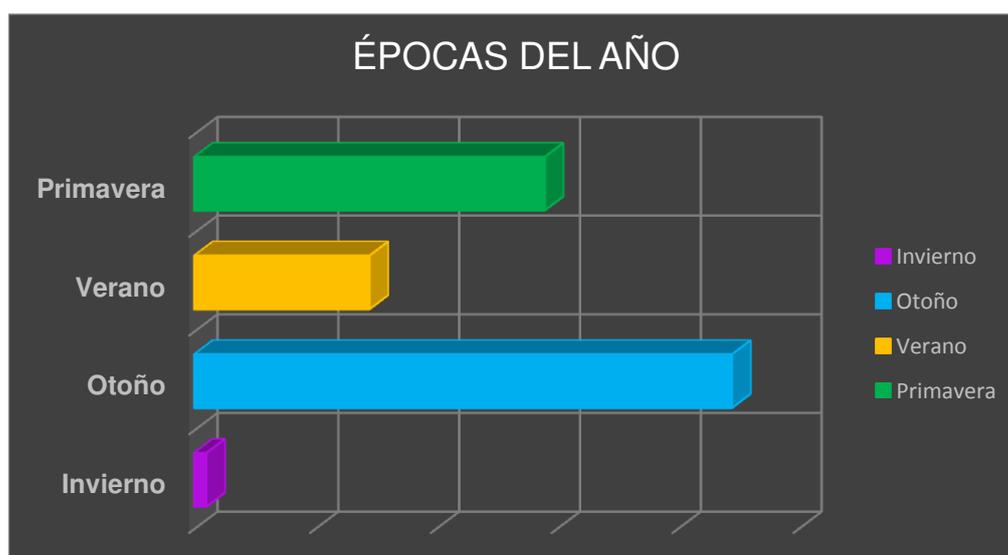


Figura 37. Grafica en porcentaje de *Alternaria* por épocas anuales durante el estudio realizado en 2014-2015.

Respecto a las estaciones de monitoreo, *Alternaria* estuvo presente en las cuatro estaciones. En tres de ellas en mayor porcentaje, como es el caso de San Cristóbal con 33%, Aeropuerto con 31% y San Mateo con 28%, mientras que Oxtotitlán represento a la minoría con 9% (Figura 38).



Figura 38. Grafica en porcentaje de *Alternaria* por estaciones de monitoreo durante el estudio realizado en 2014-2015.

9.7 Correlación entre *Alternaria* y los parámetros ambientales

Para la correlación se utilizaron los parámetros ambientales, dirección y velocidad del viento, temperatura del ambiente y humedad relativa. En la que, humedad relativa y velocidad del viento mostraron tener mayor relación con *Alternaria*, pero en diferente época del año.

En primavera, *Alternaria* tuvo una relación positiva únicamente con el parámetro dirección del viento, con una $r=0.8$ y una $r^2=0.6$, mientras que en los demás parámetros ambientales su relación fue negativa. En verano, *Alternaria* mostro tener una relación positiva perfecta con humedad relativa con una $r=0.9$ y una $r^2=0.9$, en relación con los demás parámetros ambientales, estos mostraron una relación negativa. Finalmente en otoño, *Alternaria* no mostro tener ninguna relación significativa con ninguno de los parámetros de interés.

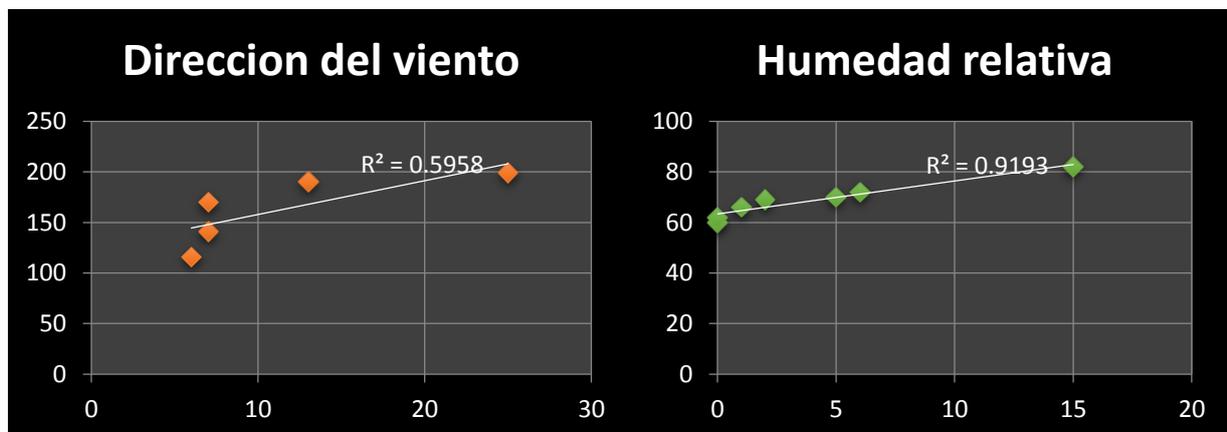


Figura 39. Grafica de correlación entre *Alternaria* y los parámetros Dirección del viento (primavera) y Humedad relativa (verano).

Antes de concluir es importante mencionar que para este análisis no se tomó en consideración la época de invierno, ya que como se mencionó en el apartado anterior, estos muestreos únicamente se realizaron en una estación de monitoreo que no fue siempre la misma.

9.8 Aislados de *Alternaria* en medio PDA

Para la obtención de los aislados en PDA se utilizaron las colonias obtenidas en los muestreos de impactación directa y por toma de filtro, de los cuales se lograron purificar 33 aislados de *Alternaria* (Figura 39).

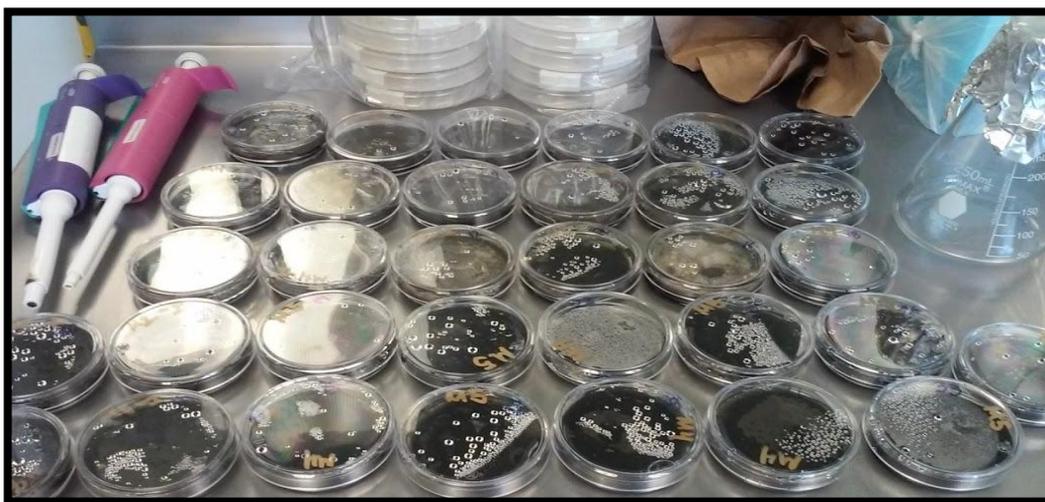


Figura 40. Aislados de *Alternaria* purificadas en medio PDA.

9.9 Actividad proteolítica de *Alternaria*

Para la proteólisis se utilizaron las 33 aislados obtenidas en PDA, con el objetivo de seleccionar aquellas que tuvieran mayor capacidad enzimática mediante el **Índice Enzimático: \bar{x} halo/ \bar{x} colonia**; expresado tanto estadísticamente como por documentación fotográfica. En el caso particular de la documentación por fotografía se pudo apreciar que algunos aislados de *Alternaria* mostraron tener efecto en el tratamiento, ya que la formación de los halos y el incremento de las colonias fueron evidentes en el transcurrir de las horas críticas y de los días posteriores a estas.

Donde, en las primeras 24 horas se apreció la formación de un halo pequeño y la aparición de diminutas manchas oscuras características de las colonias de *Alternaria*; para este día los halos midieron aproximadamente entre 0.8 a 1 cm de diámetro y las colonias entre 0.6 y 0.8 cm de diámetro (Figura 41).

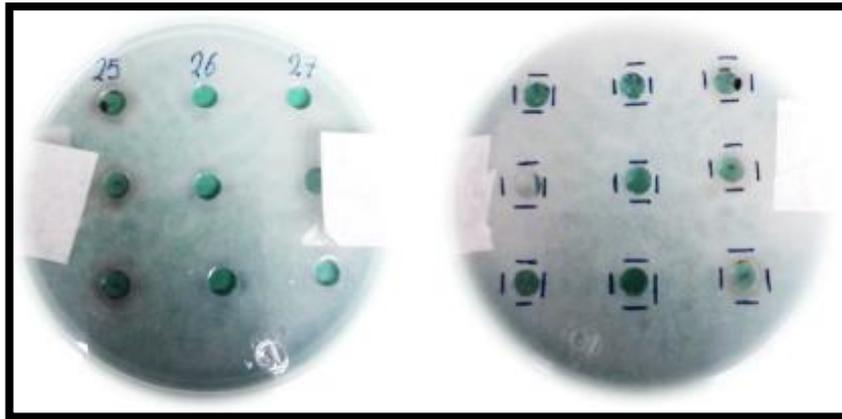


Figura 41. Documentación fotográfica de *Alternaria* en medio leche descremada (24 horas).

Durante las 48 horas se observó un halo más diferenciado y crecimiento de la colonia mostró ser exponencial (Figura 42); para este segundo día los halos midieron aproximadamente entre 1.1 a 2 cm de diámetro y las colonias entre 0.8 y 2.5 cm de diámetro.

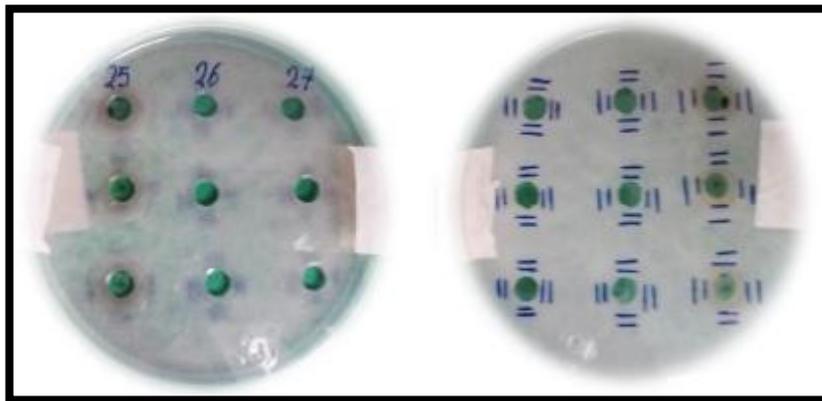


Figura 42. Documentación fotográfica de *Alternaria* en medio leche descremada (48 horas).

A las 72 horas el incremento de los halos y de las colonias fue notorio (Figura 42); para el tercer día los halos midieron aproximadamente entre 2.1 y 3.1 cm de diámetro, mientras que las colonias entre 0.8 y 2.8 cm de diámetro.

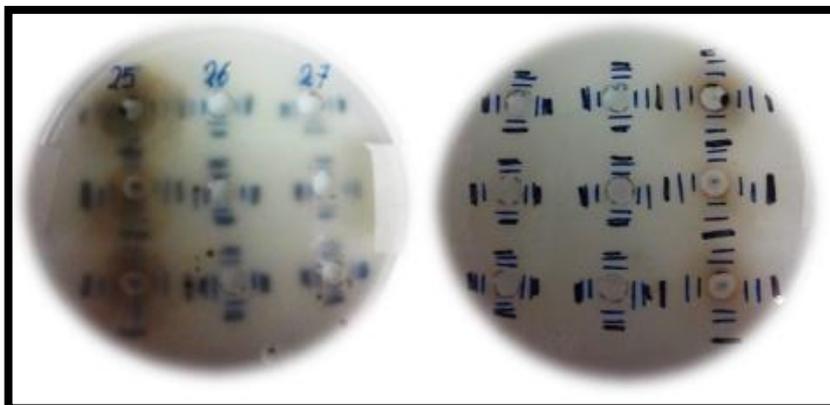


Figura 43. Documentación fotográfica de *Alternaria* en medio leche descremada (72 horas).

Aunque las horas críticas para este experimento solo abarcan las primeras 72 horas, se tomó la decisión de observar el crecimiento de los halos y la expansión de las colonias por más tiempo; con el fin de conocer si *Alternaria* era capaz de sobrevivir utilizando este medio. El resultado fue muy grato al transcurrir un mes de prueba (Figura 44).

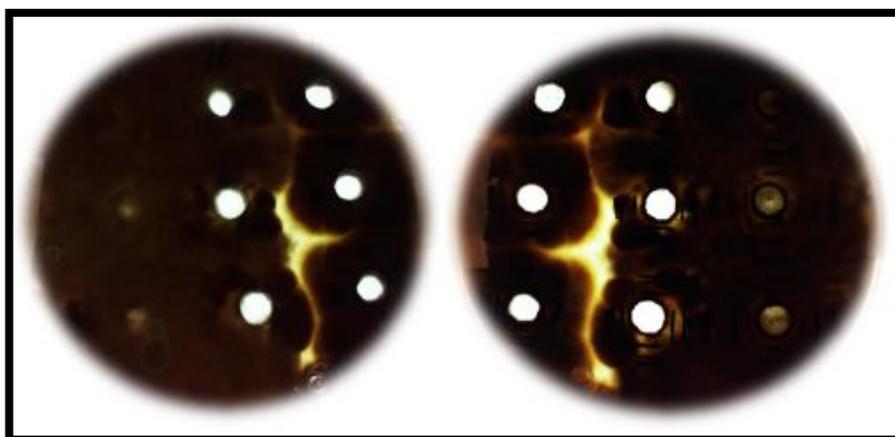


Figura 44. Documentación fotográfica de *Alternaria* en medio leche descremada (día 30).

No obstante, los datos obtenidos no cumplieron con el supuesto de normalidad por lo que se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un $\alpha=0.05$ en el que se encontraron diferencias significativas entre la capacidad enzimática de las 33 aislados $p<0.0001$.

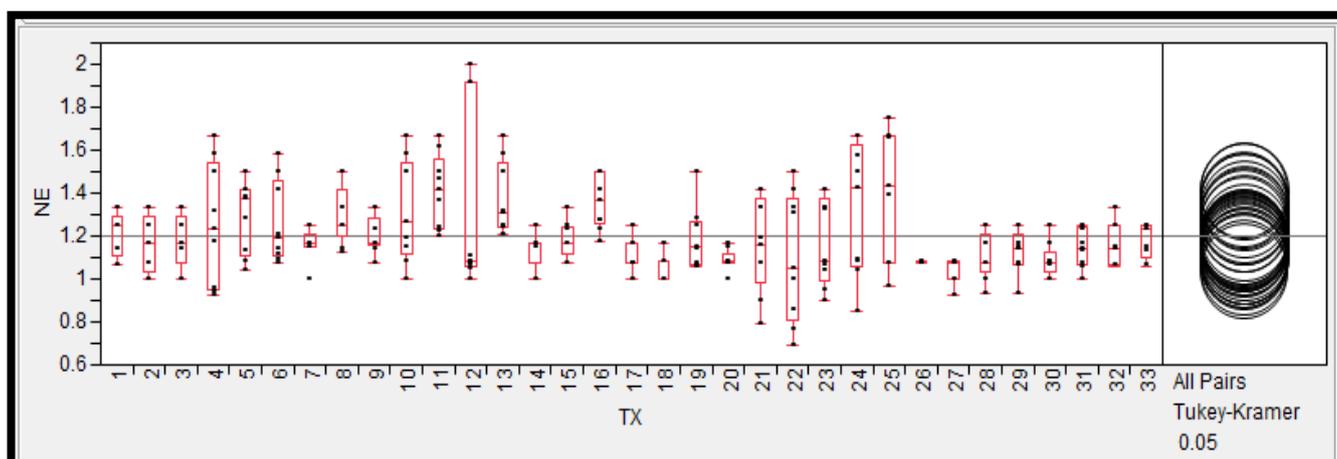


Figura 45. Diagrama de cajas de los 33 aislados de *Alternaria* en medio leche descremada.

En el diagrama de cajas (Figura 45) se puede observar que los aislados mostraron tener efecto en los tratamientos, de forma diferente (eficiencia). Por lo tanto se tomó la decisión de realizar “la comparación múltiple de pares Tukey-Kramer” con un p-Value de 0.05; en el que nuevamente aparecieron diferencias significativas entre los 33 tratamientos. Confirmados en la tabla descriptiva de Niveles, donde se delimitaron de tres grupos (A, AB y ABC).

Means Comparisons		
Comparisons for all pairs using Tukey-Kramer HSD		
Level		Mean
11	A	1.4104748
25	A	1.4087036
13	A B	1.3692861
16	A B	1.3605104
12	A B	1.3577274
24	A B C	1.3229622
10	A B C	1.3013492
5	A B C	1.2931039
8	A B C	1.2890212
6	A B C	1.2584848
4	A B C	1.2556191
1	A B C	1.2158730
19	A B C	1.1977040
9	A B C	1.1975987
15	A B C	1.1875254
3	A B C	1.1825397
33	A B C	1.1808761
2	A B C	1.1746032
23	A B C	1.1688666
7	A B C	1.1638177
32	A B C	1.1627289
21	A B C	1.1506757
31	A B C	1.1458944
14	A B C	1.1360399
29	A B C	1.1233771
28	A B C	1.1094577
17	A B C	1.1063289
22	A B C	1.1034932

Figura 46. Prueba de Tukey con $\alpha=0.05$ de los 33 tratamientos de *Alternaria* en medio leche descremada. El comparativo muestra que hay tres grupos (A), (AB) y el (ABC).

Por consiguientes se tomo la decisión de considerar uno de cada grupo (Figura 46), agregando el criterio de halos bien diferenciados y colonias con pigmentación oscura, para el experimento final con plumas de aves. Contemplando del grupo (A) la cepa 25, del grupo (AB) la cepa 13 y del grupo (ABC) la cepa 10 (Figura 47).

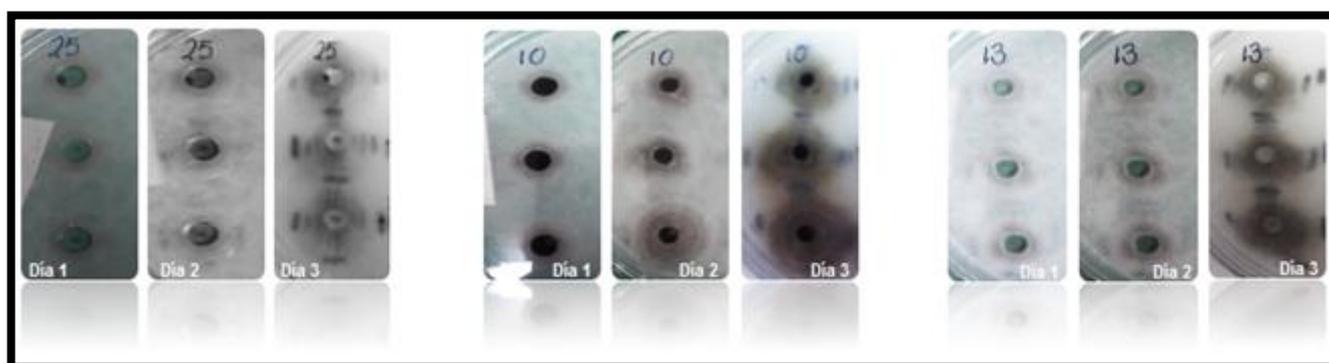


Figura 47. Aislados seleccionadas para el experimento de plumas de ave.

9.10 Actividad queratinolítica de *Alternaria*

Este procedimiento se llevó a cabo en dos fases, la primera se realizo un medio de sales con plumas de ave trituradas en la que se midieron los halos de las aislados 10,13 y 25 (mediante el **Índice Enzimático: \dot{x} halo/ \dot{x} colonia**) seleccionadas por el método de proteólisis con medio leche descremada. El objetivo fue observar y registrar si *Alternaria* mostraba tener efecto en el tratamiento de actividad queratinolítica, por lo que en esta primera fase se optó por beneficiar a *Alternaria* con un medio de sales para posteriormente tener la posibilidad de que utilizara las plumas de ave.

En las primeras 24 horas se apreció la formación de halos semitransparente con colonias bien diferenciadas, mucho más pronunciadas que las observadas en el medio leche descremada. Para este día los halos midieron aproximadamente entre 0.9 y 1.3 cm de diámetro, mientras que las colonias entre 0.6 y 0.9 (Figura 48).

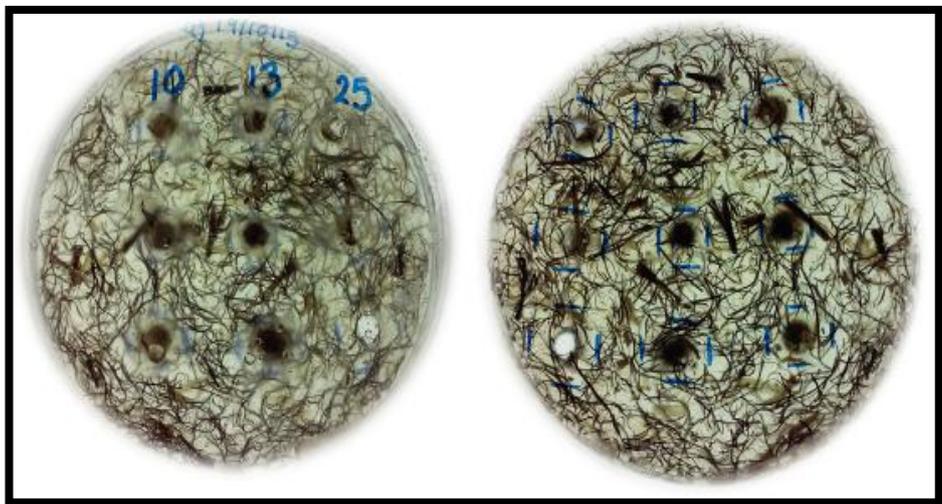


Figura 48. Documentación fotográfica de las aislados 10, 13 y 25 de *Alternaria* en medio de sales con plumas de ave trituradas (24 horas).

Transcurridas las 48 horas los halos incrementaron de diámetro y las colonias aumentaron favorablemente de tamaño (Figura 49); para este segundo día los halos midieron aproximadamente entre 1.4 y 2.1 cm de diámetro y las colonias entre 1 y 2 cm de diámetro.

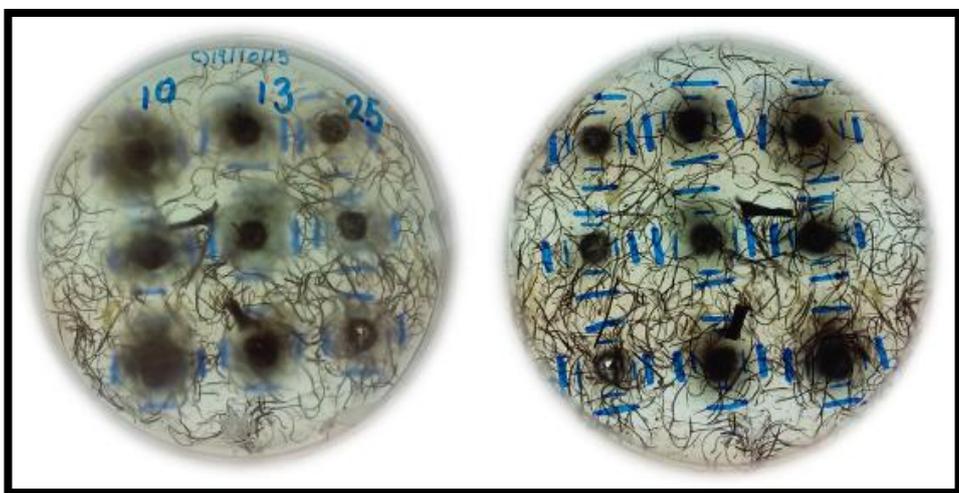


Figura 49. Documentación fotográfica de las aislados 10, 13 y 25 de *Alternaria* en medio de sales con plumas de ave trituradas (48 horas).

A las 72 horas el crecimiento fue considerable tanto de los halos como de las colonias (Figura 50); para este día los halos midieron aproximadamente entre 2.1 y 2.6 cm de diámetro, mientras que las colonias entre 2 y 3 cm de diámetro.

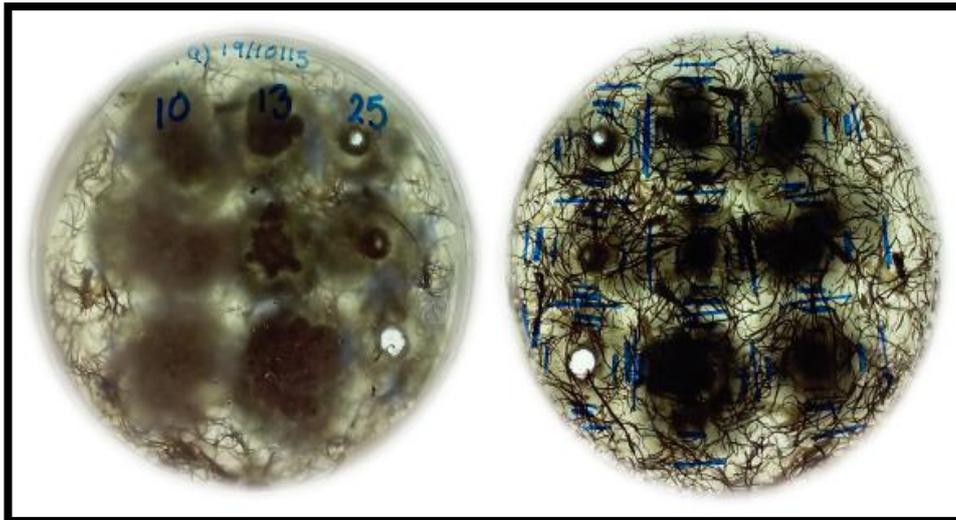


Figura 50. Documentación fotográfica de las aislados 10, 13 y 25 de *Alternaria* en medio de sales con plumas de ave trituradas (72 horas).

De igual manera que en ensayo de leche descremada, se consideró apropiado dejar transcurrir un mes de prueba para observar si las aislados de *Alternaria* podrían sobrevivir en el medio de sales con pluma de ave trituradas. El resultado fue nuevamente grato (Figura 51).

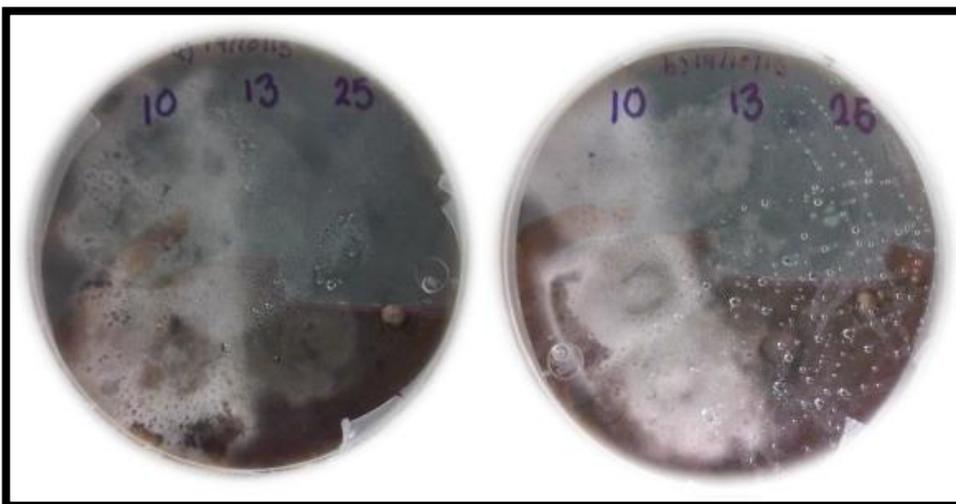


Figura 51. Documentación fotográfica de las aislados 10, 13 y 25 de *Alternaria* en medio de sales con plumas de ave trituradas (día 30).

Referente a los datos obtenidos, estos no cumplieron con el supuesto de normalidad por lo que se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un $\alpha=0.05$ en el que no se encontraron diferencias significativas entre la capacidad enzimática de los tratamientos no. 10, 13 y 25 con una $p>0.1824$.

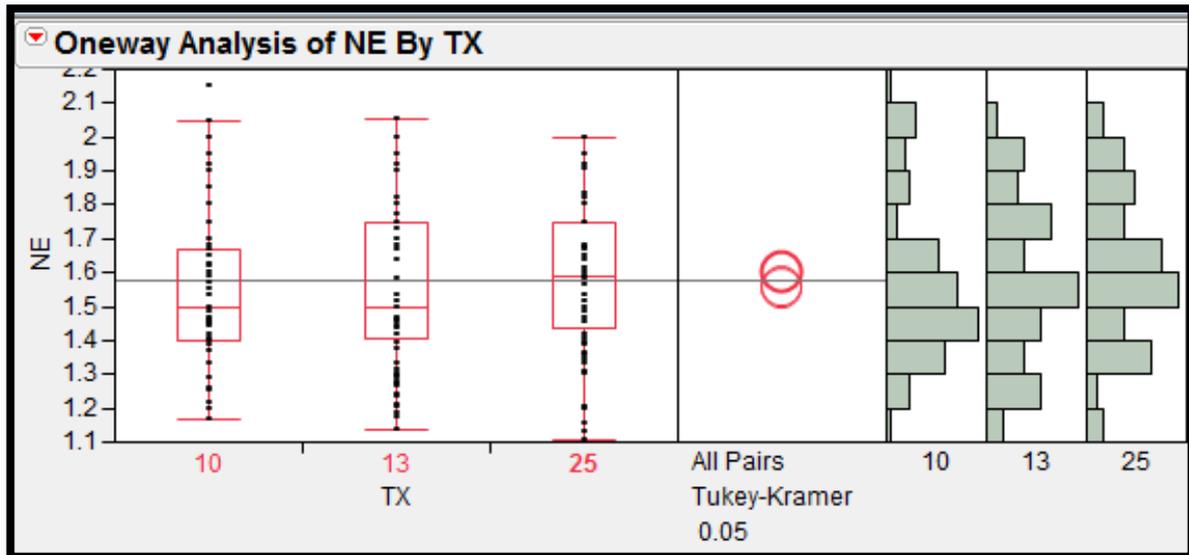


Figura 52. Diagrama de cajas e histograma de los tratamientos no. 10, 13 y 25 de *Alternaria* en medio de sales con plumas de ave trituradas.

En el diagrama de cajas se puede observar que los tratamientos mostraron tener efectos similares (eficiencia). Siendo el 50% de la eficacia, del parámetro 1.4 al 1.75 del nivel del Índice Enzimático. Es importante aclarar, que en el caso particular del tratamiento no. 10; este mostro un dato atípico que sale del comportamiento general de los demás parámetros (Figura 52).

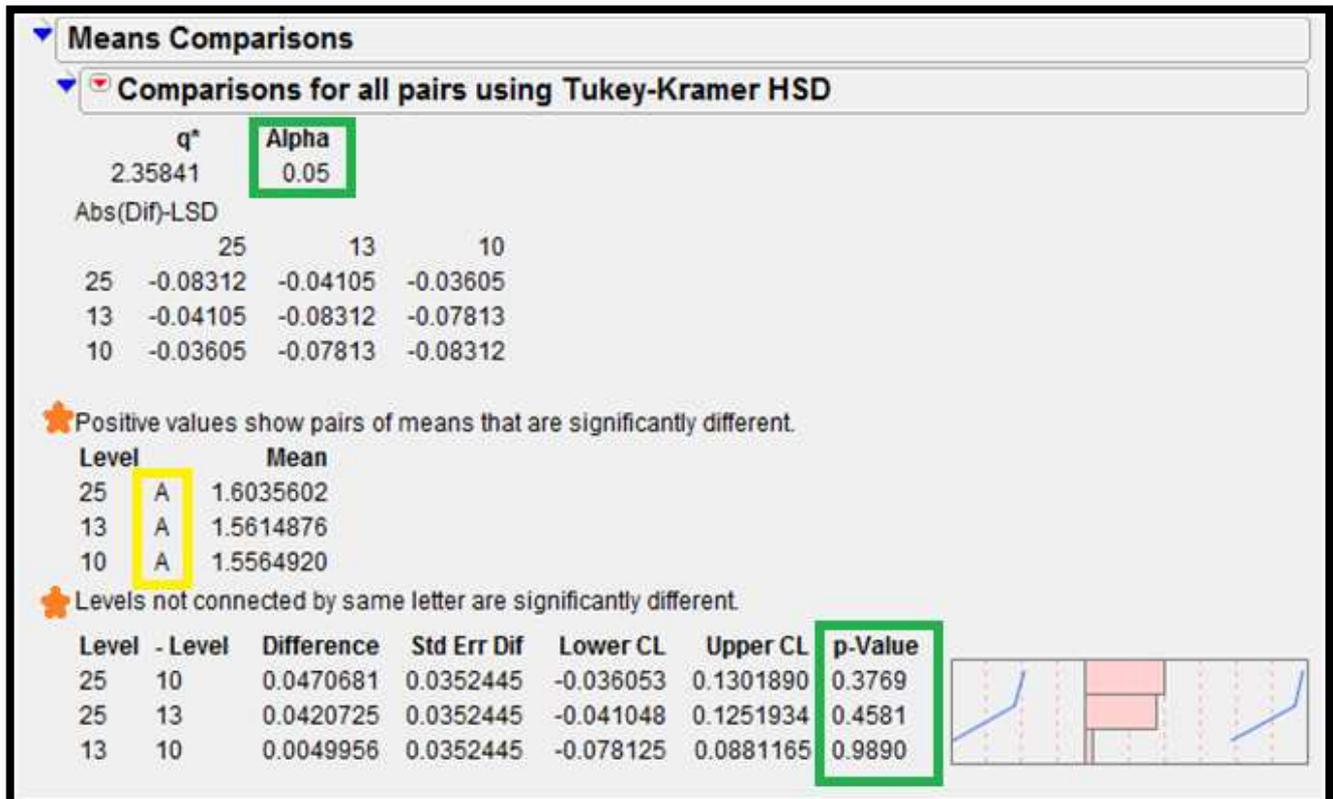


Figura 53. Prueba de Tukey con $\alpha=0.05$ de los tratamientos no. 10, 13 y 25 de *Alternaria* en medio de sales con plumas de ave trituradas. El recuadro verde representa el p-Value de cada tratamiento, mientras que el recuadro amarillo muestra el grupo en el que se encuentran los tratamientos.

En cuanto a “la comparación múltiple de pares Tukey-Kramer con una p-Value de 0.05”; mostro nuevamente, que no se encontraron diferencias significativas. Esto se puede corroborar con la tabla descriptiva de Niveles, donde se aprecia que todos los tratamientos pertenecen al mismo grupo (A), donde la $p=0.3769$ para el tratamiento no. 10 y 25, $p=0.4581$ para el tratamiento no. 13 y 25 y una $p=0.9890$ en el tratamiento no. 10 y 13 (Figura 53).

En la segunda fase de la actividad queratinolítica, se utilizó agar agua con plumas de aproximadamente 1 cm de largo, con el propósito de que *Alternaria* utilizara únicamente las plumas como fuente adecuada para su crecimiento y desarrollo. Teniendo como base el **Índice de Crecimiento y Desarrollo Fúngico (ICDF)**. Es relevante acotar, que los aislados 10, 13 y 25, nuevamente fueron utilizados para este experimento.

9.11 Índice de crecimiento y desarrollo fúngico

❖ Descripción del ICDF: 0.5

Germinación de conidios con uno o dos tubos germinales en el área cercana al sustrato.

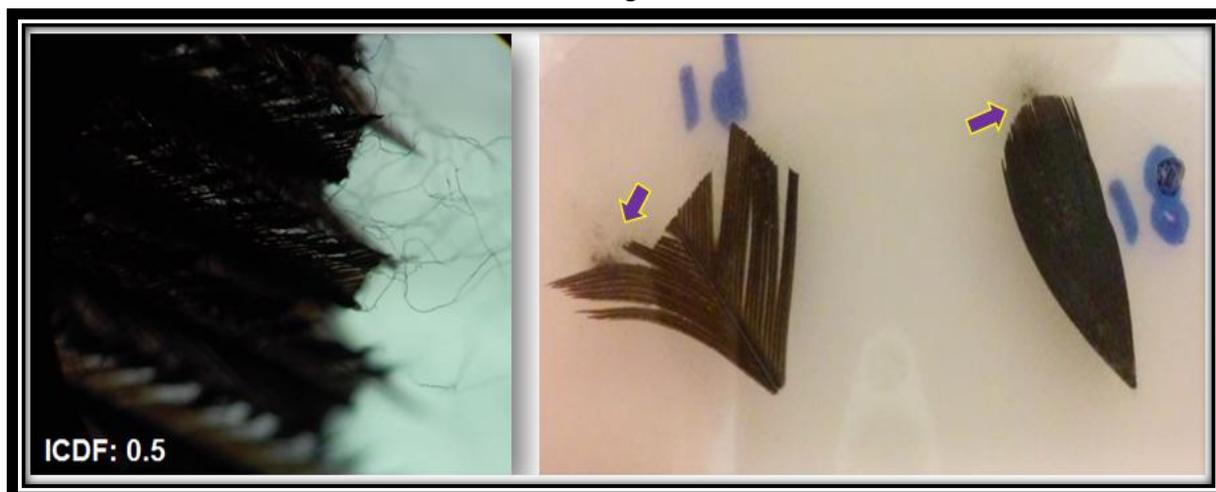


Figura 54. Efecto de *Alternaria* en plumas de ave, parámetro del ICDF: 0.5.

❖ **Descripción del ICDF: 1.0**

Crecimiento de tubos germinales y presencia de hifas.

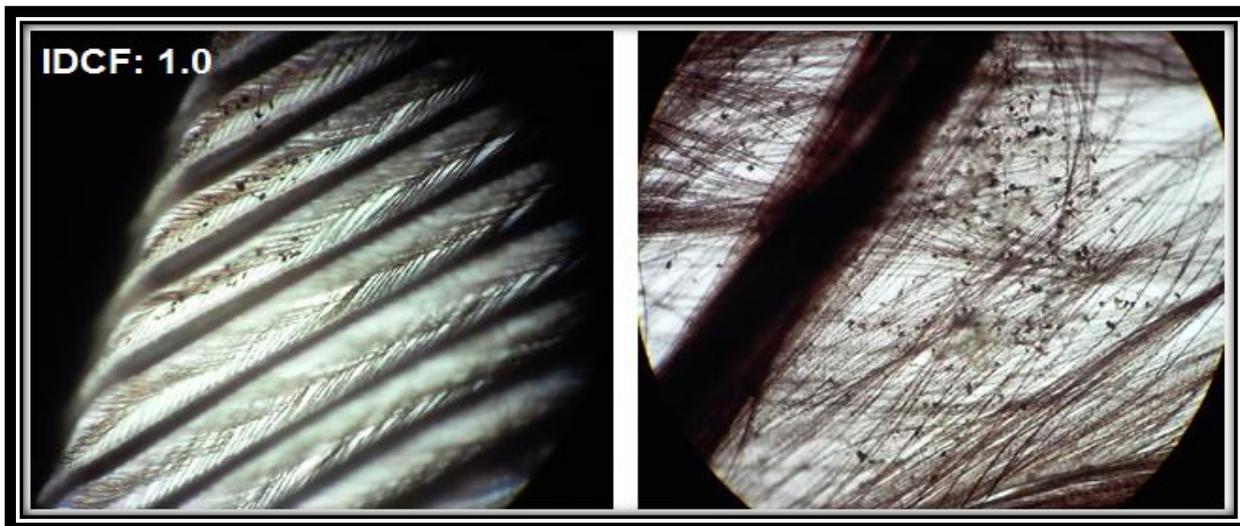


Figura 55. Efecto de *Alternaria* en plumas de ave, parámetro del ICDF: 1.0.

❖ **Descripción del ICDF: 1.5**

Crecimiento inicial del hongo orientado hacia el sustrato queratinoso y primer contacto de las hifas con él.

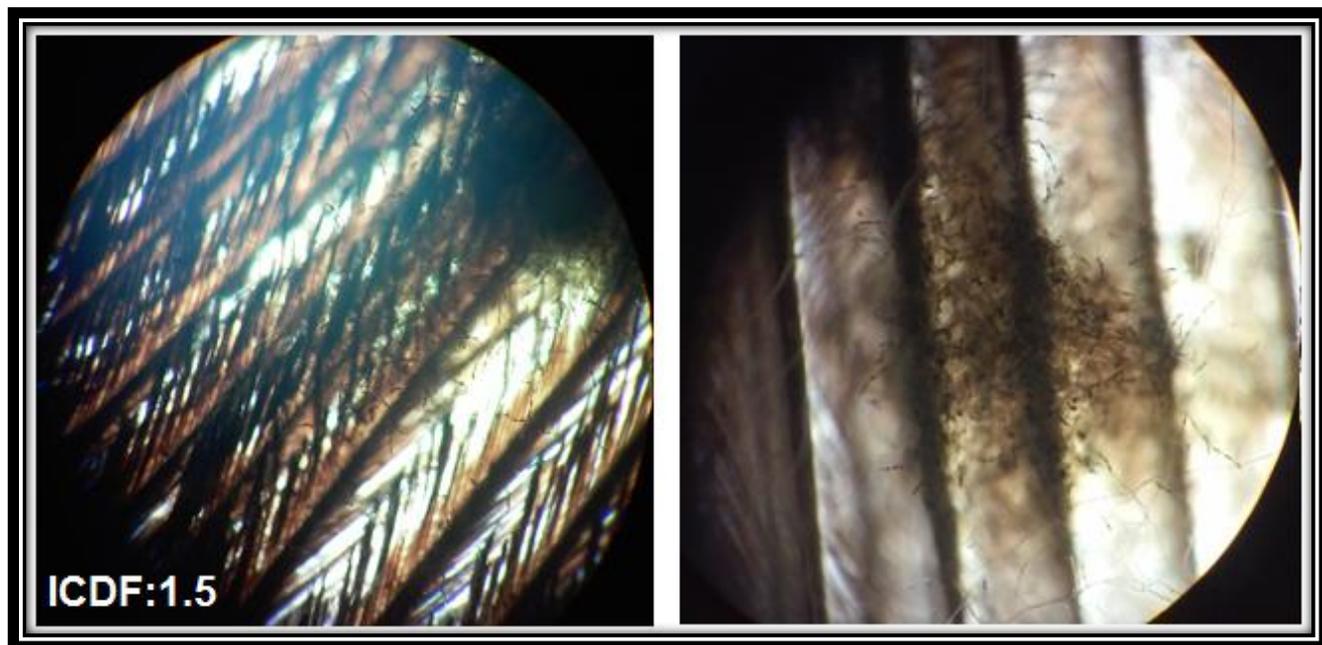


Figura 56. Efecto de *Alternaria* en plumas de ave, parámetro del ICDF: 1.5.

❖ **Descripción del ICDF: 2.0**

Crecimiento micelial en la superficie del sustrato.

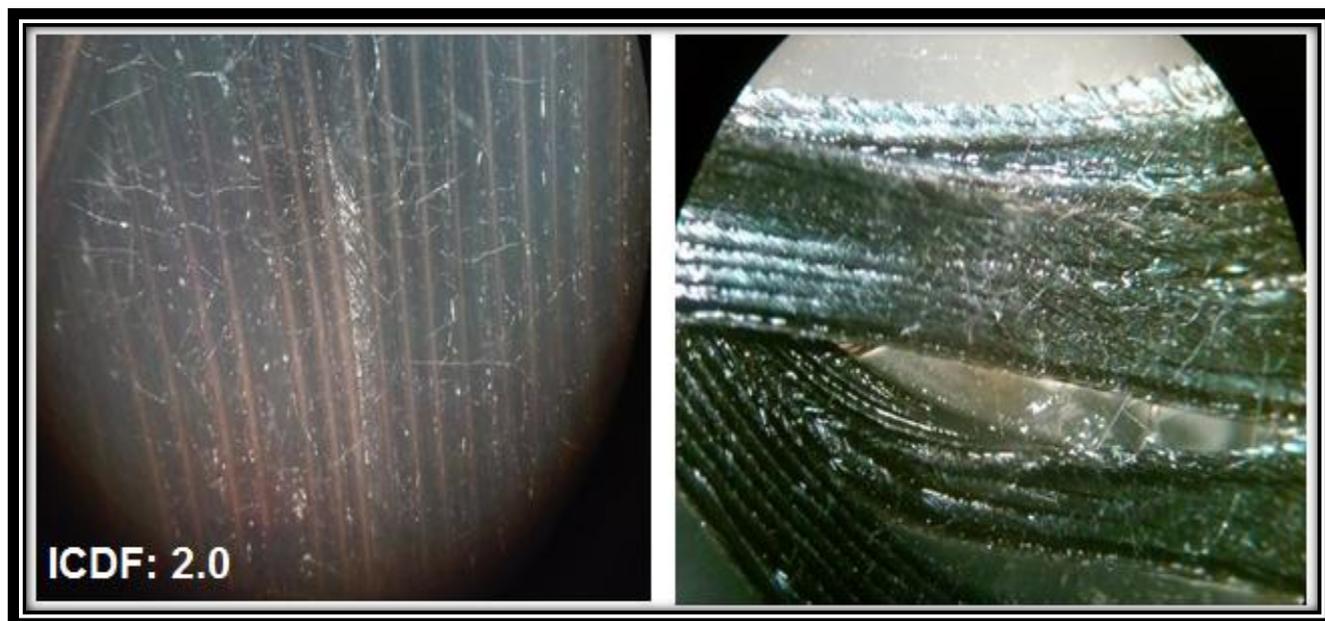


Figura 57. Efecto de *Alternaria* en plumas de ave, parámetro del ICDF: 2.0.

❖ **Descripción del ICDF: 2.5**

Inicio de esporulación, conidios que cubren el sustrato.

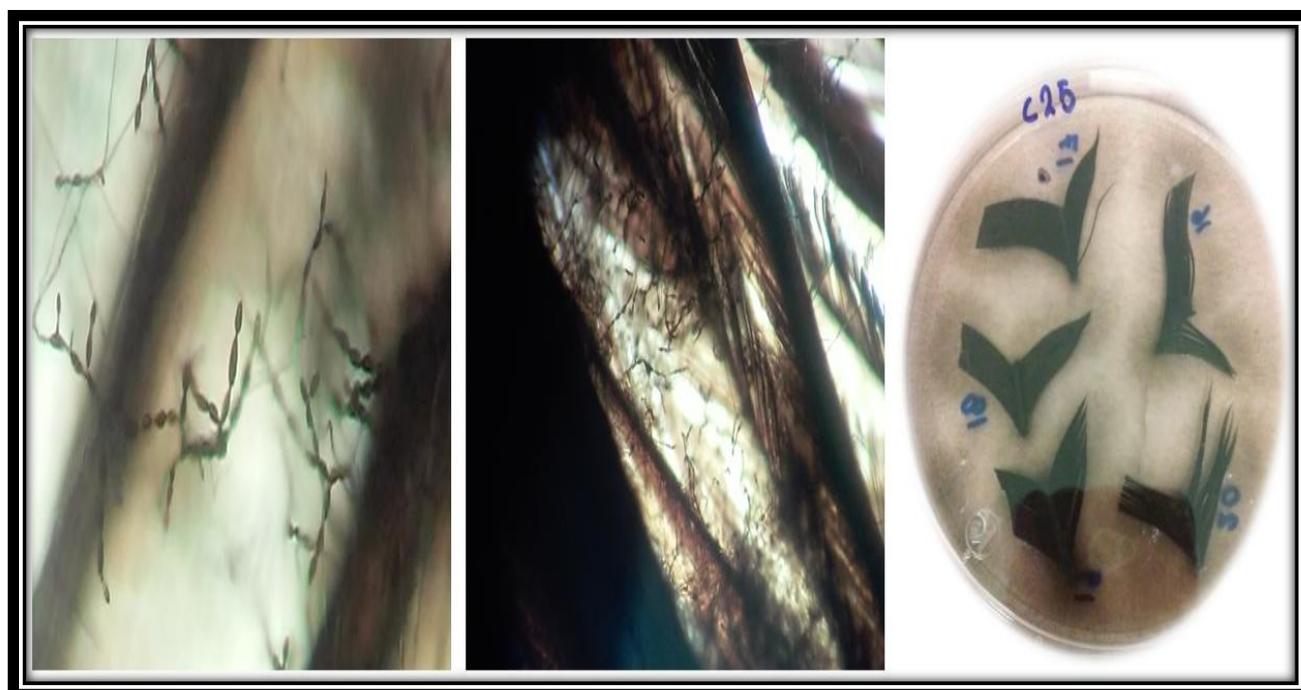


Figura 58. Efecto de *Alternaria* en plumas de ave, parámetro del ICDF: 2.5.

❖ **Descripción del ICDF: 3.0**

Esporulación completa, sustrato cubierto de micelio y conidios.

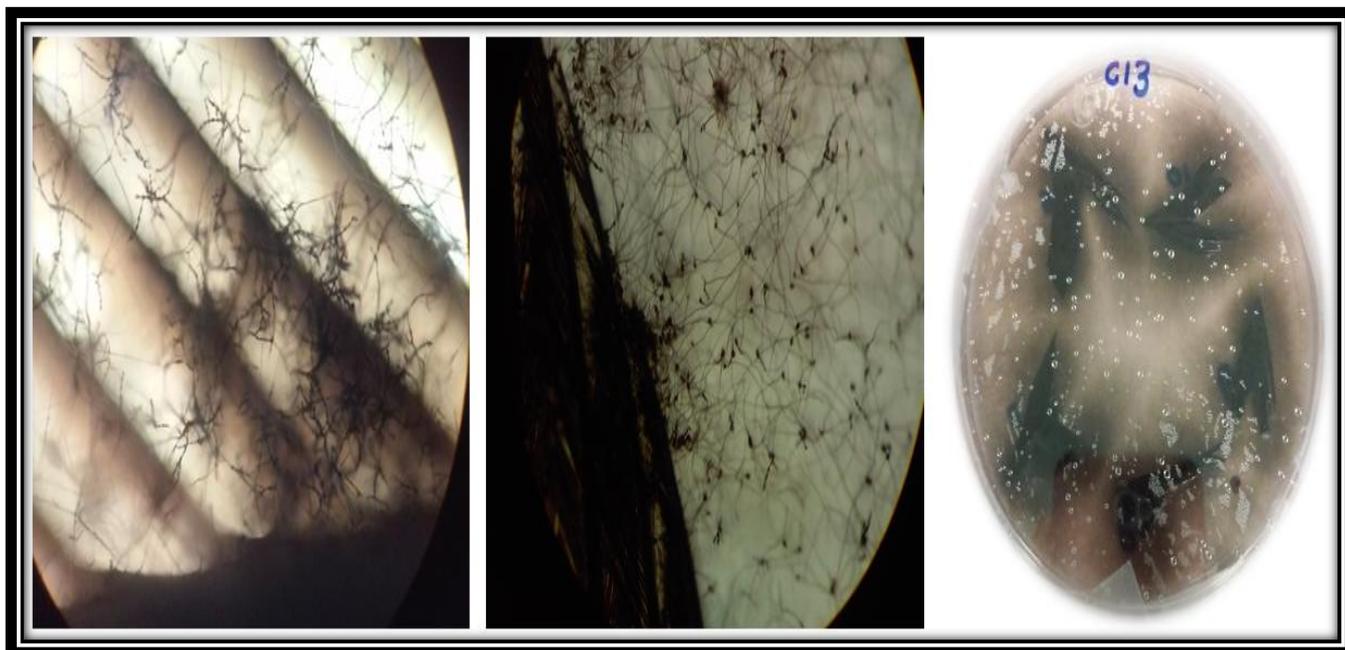


Figura 59. Efecto de *Alternaria* en plumas de ave, parámetro del ICDF: 3.0.

9.12 Observaciones diarias

Las primeras 24 horas, los tres aislados mostraron tener un parámetro de 2 según el ICDF; el cual menciona que ya hay crecimiento micelial en la superficie del sustrato. Es decir, *Alternaria* en tan solo unas horas paso de la germinación de conidios e hifas al crecimiento del hongo utilizando el sustrato con la aparición ligeramente del micelio.

Durante las siguientes 48 horas, las tres aislados avanzaron considerablemente encontrándose en el parámetro 2.5 con base en el ICDF; donde ya hay esporulación y recubrimiento de las plumas.

Para las 72 horas, *Alternaria* había llegado al parámetro 3 del ICDF; donde su esporulación ya era completa con presencia de conidios y micelio.

Nuevamente se dejó transcurrir un mes (Figura 60) para cerciorarnos que *Alternaria* estuviera utilizando las plumas como fuente de alimentación, favoreciendo así su crecimiento y desarrollo en días posteriores. Finalmente el resultado fue exitoso.

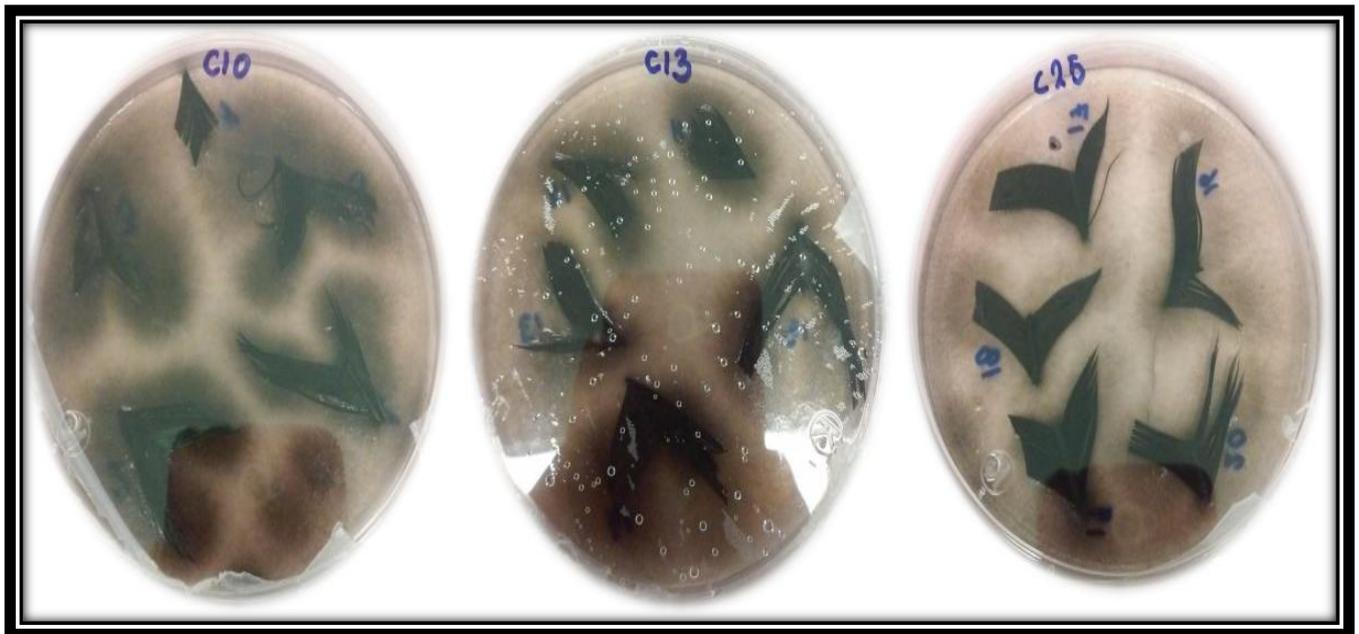


Figura 60. Documentación fotográfica de las aislados 10, 13 y 25 de *Alternaria* en agar agua con plumas de ave (día 30).

10. Discusión

El Valle de Toluca es una de las zonas conurbadas más importante del Edo. de México y la quinta a nivel nacional (Proaire, 2012), después de la CDMX, Guadalajara, Monterrey y Puebla (Arteaga, 2005; Martínez-Galindo, 2011). Sin embargo la zona metropolitana del Valle de Toluca ha presentado una modificación en sus actividades económicas en los últimos, ya que paso de ser una economía sustentable rural a una industrial y de servicios, trayendo consigo el crecimiento demográfico, el incremento de la industria, la flota vehicular, el elevado consumo de combustibles y patrones inadecuados de desplazamiento urbano (INEGI, 2010).

Todos estos factores traen como consecuencia el aumento de emisiones a la atmósfera y la contaminación del aire, por lo que en esta investigación se consideró importante realizar estudios de calidad del aire enfocados a microorganismos fúngicos y su asociación con las $PM_{2.5}$ y los parámetros ambientales.

En la presente investigación los géneros más abundantes durante todo el muestreo fueron *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* y *Alternaria*, considerados cosmopolitas y de gran abundancia en todo el mundo (Sharma *et al.*, 2011; Almaguer-Chávez y Rojas-Flores, 2013; Sánchez-Espinosa y Almaguer-Chávez, 2014), de ahí que obtuvieron juntos el 71% de abundancia total del muestreo realizado en 2014-2015 en el Valle de Toluca.

Asimismo, la presencia de estos géneros pueden estar vinculadas a enfermedades respiratorias, alergias, asma, conjuntivitis y diversos padecimientos de la piel. Además de que comparten características tales como la tolerancia a temperaturas arriba de los $20^{\circ}C$, cuentan con producción de micotoxinas y son parásitos oportunistas de humanos. En el

caso de *Alternaria* y *Cladosporium* son géneros de presencia dominante en el exterior, mientras que *Fusarium* es un género ocasional, en cuanto a *Penicillium* y *Aspergillus* son géneros abundantes en interiores (Zebeldia *et al.*, 2012).

Frecuentemente los casos de asma alérgica son etiológicamente fúngicos, dominadas principalmente por géneros como *Alternaria* con 8.2%, *Aspergillus* 1.4%, *Cladosporium* 1.4%, *Penicillium* 0.4% y otros sin especificar con 0.2%. La Sociedad de Alergología e Inmunología Clínica menciona que los síntomas alérgicos más comunes son rinoconjuntivitis con 55.5% y asma 28%, siendo la causa principal el polen, epitelios de animales y esporas de hongos (Rendueles, 2015). Hay que resaltar que la literatura correspondiente a este tipo de estudios en México es escasa por lo que la mayoría de estos géneros han sido previamente reportados por autores como López-Martínez *et al.*, 1986; Rosas *et al.*, 1997; Calderón *et al.*, 1997; Castellanos-Moguel *et al.*, 2007; Gutiérrez-Reyes *et al.*, 2009; López-Urbina, 2011, Galindo-Martínez, 2011 y Martínez-Hernández, 2013.

En cuanto a la diversidad de géneros presente por épocas anuales, verano mostro tener una mayor cantidad de géneros y UFC, seguido de otoño, primavera e invierno. Kasprzyk *et al.*, en 2004 realizaron un estudio en Polonia donde la mayor concentración de esporas la obtuvo verano, seguido de primavera, otoño e invierno. López-Urbina en 2011 menciona que en la CDMX consiguió una mayor cantidad de UFC en invierno, seguido de primavera, otoño y verano; sin embargo los datos reportados por este autor en verano, indican que obtuvo 2133 UFC, datos similares a los que se encontraron en verano en el Valle de Toluca (2737 UFC). Mientras que Gutiérrez-Reyes *et al.*, en 2009 menciona que la composición de bioaerosoles en las épocas de verano y otoño corresponden principalmente a polen, esporas, diversos microorganismos y fragmentos. Vale la pena señalar que la cantidad de esporas puede variar dependiendo de la ubicación, geografía del lugar, condiciones climáticas y meteorológicas, por lo que es difícil atribuir este tipo de fluctuaciones a un factor o época con certeza.

En ese mismo sentido, podemos añadir el comportamiento de las UFC con respecto a las estaciones de monitoreo y las épocas anuales, siendo San Cristóbal, Aeropuerto y Oxtotitlán las estaciones que mostraron patrones similares, donde la mayor cantidad de géneros se encontró en otoño, seguido de verano y primavera, mientras que para las UFC tuvo una mayor concentración en verano, seguido de otoño y primavera. En el caso de San Mateo esta fue la única estación que mostro un modelo lineal entre la concentración y la cantidad de géneros (verano, otoño y primavera). Martínez-Galindo en 2011 menciona que durante el muestreo realizado en el Valle de Toluca los parámetros ambientales mostraron estar elevados en los meses de Septiembre a Noviembre, correspondiente a la época de verano y otoño, por lo que la concentración de partículas suspendidas elevadas podría atribuirse a esos factores, no obstante en esta investigación los parámetros más elevados no oscilaron entre esas épocas por lo que resulta aventurado relacionarlo con los parámetros ambientales proporcionados por la RAMAT.

Ante la situación planteada queda añadir que las mayores concentraciones obtenidas de *Alternaria* fueron 774 UFC en San Mateo, seguido de Oxtotitlán con 729 UFC y Aeropuerto con 715 UFC, esto puede deberse a que San Mateo cuenta con una gran cantidad de fábricas enfocadas a diferentes productos, centros automotrices y a que está ubicada en una zona considerada como rural debido a la cantidad de amplios parajes, mientras que Aeropuerto cuenta con el vuelo y aterrizaje de aviones que vienen y van a diferentes puntos, también se encuentra rodeado de fábricas y centros de entretenimiento (carreras y pruebas de autos), trayendo consigo la resuspensión frecuente de partículas. En cuanto a Oxtotitlán es una zona considerada como semi urbanizada por lo que cuenta con diversos servicios como sitios de taxis, escuelas, casas, parques y algunos centros automotrices, quizá debido al incremento de vehículos por habitante, la condición de este lugar se vea afectada.

En lo pertinente a *Alternaria* este mostro tener una mayor porcentaje en la época de otoño, seguido de primavera y verano, estos datos son similares a los planteados por Rocha-Estrada *et al.*, en 2013 y Gonzalo *et al.*, en 1996, donde las mayores concentraciones de *Alternaria* corresponden a la época de otoño. En cuanto a primavera y verano su correlación está ligada positivamente a los parámetros dirección del viento y humedad relativa, por lo que estos pudieron favorecer a *Alternaria*; Gottwald *et al.*, en 1997 realizaron una simulación con una cámara de ambiente controlado por una computadora (CCEC) en la que encontraron que la lluvia beneficia la liberación de esporas, pudiendo así explicar la relación entre verano y el parámetro humedad relativa, mientras que para primavera y el parámetro dirección del viento, se sabe que las corrientes de aire cercanas al Valle de Toluca van del Sureste al Oeste y al vincularlo con la topografía del lugar favorecen la dispersión de contaminantes (Gobierno del Estado de México, 2005).

Diversos autores (Rizzi-Long *et al.*, 2009; Kilic *et al.*, 2010, López-Urbina, 2011) mencionan diferentes temporalidades en las cuales *Alternaria* mostro tener una mayor concentración de esporas, sin embargo Rendueles *et al.*, en 2015 menciona que los actuales cambios climáticos están afectando los diferentes procesos aerobiológicos (emisión, dispersión, transporte y deposición) de los alérgenos, por lo que es complicado saber o predecir su comportamiento.

Una vez expuesto lo anterior, a continuación nos enfocaremos en las pruebas proteolítica y queratinolíticas donde *Alternaria* mostro tener efecto de tratamiento, tanto estadísticamente como por documentación fotográfica. Gauthier *et al.*, 2012 y Blackwell en 2011 mencionan que de los 1.5- 5.1 millones de especies fúngicas, se han estimado 270 000 que son asociadas con plantas, de las cuales 325 se conoce que infectan humanos, aunque se desconocen aún sus mecanismos. Algunos de estos utilizan diversos métodos de infección, principalmente relacionados por la inhalación de bioaerosoles o por la penetración durante un traumatismo, además de que mayoritariamente son dematiáceos derivados de la clase *dothideomycetes* como *Alternaria*.

Existe mucha documentación acerca de la patogenicidad de *Alternaria* y sus alteraciones en plantas, así como el registro de innumerables casos clínicos de afecciones ocasionados a humanos y algunos animales (Gomes *et al.*, 2011; Shakurnia *et al.*, 2013; Konidiaris *et al.*, 2013; Chakaraborty *et al.*, 2014; Sečniková *et al.*, 2014); no obstante la información disponible solo se remite a esto, por lo que hay muy poca documentación conocida o estudiada de las enzimas asociadas, mecanismos de acción y protocolos para su estandarización.

Es importante mencionar que *Alternaria* es protagonista de diferentes enfermedades alérgicas como rinitis, bronquitis, neumonitis hipersensitiva y asma (O’Gorman y Fuller, 2008); así como de algunas enfermedades micóticas en piel y uñas, infecciones corneales y síndrome de Cushing (Palacio y Cuétara, 2009). Por lo que toda la información adyacente únicamente es ligada por los aislados obtenidos de las personas afectadas y la aparición del hongo, acompañado de algún traumatismo, un sistema inmunocomprometido o con alguna enfermedad severa terminal; sin embargo todavía no se entiende como es que se adhiere, penetra y paracita. Aún falta mucho que dilucidar bajo la luz de algún método científico que respalde con pruebas los factores ligados a esta problemática.

En contraste esta investigación puede esclarecer un pequeña parte del rompecabezas; con la vinculación de los datos recabados, casos y algunas enfermedades derivadas de *Alternaria*, enlazándolos con los resultados obtenidos durante este estudio, en el que se logró demostrar que *Alternaria* posee una capacidad enzimática para penetrar y degradar medio con proteínas y queratina, realizando así procesos complejos.

En cuanto a los datos estadísticos en el ensayo de actividad queratinolíticas con plumas de ave trituradas se muestra que no hay diferencias significativas entre la capacidad de los 3 tratamientos. Esto se ve reflejado en los resultados del estudio del ICDF, en el que ninguno de los tratamientos es mejor, en vista de que al transcurrir las primeras 24 horas todas llegaron a la fase 2.5, mientras que trascurridas las 78 horas las 3 se encontraban en la fase última de este experimento. Después de lo anterior expuesto, es importante señalar que el modelo de ICDF modificado por Castellanos-Moguel *et al.*, 2007 y descrito por Landa *et al.*, 1994, tuvo ligeras modificaciones para este escrito con el objetivo de determinar la patogenicidad de hongos filamentosos como *Alternaria* en medios queratinosos, utilizando parámetros numéricos como fases.

Finalmente queda agregar que algunos autores enfocados en resolver dicha incógnita como la presente, se han encontrado con detalles relevantes asociados a este género, por lo que han dado pauta para el surgimiento de nuevos paradigmas con la intención de encontrar una solución y buscar la mejora de las personas afectadas (Wadhvani *et al.*, 1985; Gughani, 2000; Rubio-Calvo *et al.*, 2001; Apprich *et al.*, 2006; Vanzzini *et al.*, 2010).

En el marco de las observaciones anteriores concluiría que a pesar de que el modelo de este estudio mostros ser exitoso, probando que *Alternaria* puede utilizar el medio leche descremada y las plumas como sustrato, favoreciendo su germinación, crecimiento y

colonización; aún falta mucho por estudiar respecto a este microorganismo, así como sus procesos, asociaciones con otros hongos y su potencial enzimático como agente proteolítico y queratinolítico.

11. Conclusión

- La diversidad de géneros encontrados en el Valle de Toluca es alta con respecto a la abundancia, siendo el género más abundante *Aspergillus* seguido de *Penicillium*.
- Las temporadas de lluvia y dirección del viento pudieron influir en cuanto al incremento de UFC en las épocas de verano y otoño en las estaciones de monitoreo.
- Las estructuras fungicas presentes en los Filtros para contaminantes químicos en la fracción PM_{2.5} fueron similares a las encontradas en las cajas Petri de Impactación directa.
- Se logró aislar *Alternaria* con éxito de los Filtros para contaminantes químicos, cumpliendo así con los objetivos planteados en esta investigación.
- Los parámetros humedad relativa y dirección del viento mostraron correlaciones positivas con las épocas de verano y primavera, por lo que estas pudieron favorecer a *Alternaria*.
- La cantidad de esporas detectadas de *Alternaria* corresponde al 4% de la abundancia total del muestreo; concentración suficiente como para sensibilizar a la población de Toluca y desencadenar enfermedades severas, de acuerdo con la literatura mencionada por Pontón *et al.*, 2002 y Grinn-Gofrón y Rapiejko, 2009.
- Las estaciones de monitoreo San Cristóbal, Aeropuerto y San Mateo mostraron tener mayores concentraciones de *Alternaria* por lo que pueden considerarse como zonas de riesgo para las personas susceptibles a este tipo de microorganismo, inmunodeprimidas, comprometidas o alérgicas.
- Para el ensayo de proteólisis con medio leche descremada, se encontraron diferencias significativas entre la capacidad enzimática de los 33 aislados $p < 0.0001$.
- Para el ensayo de actividad queratinolítica con plumas de ave trituradas, no se encontraron diferencias significativas entre la capacidad enzimática de los aislados. Siendo similares según la prueba de Kruskal Wallis.

- El Índice de crecimiento y desarrollo fúngico mostro que las 3 aislados utilizaron el medio queratinoso favorablemente y a la par, por lo que no se encontró una cepa con capacidades mayores a las demás.
- *Alternaria* posiblemente como género tenga el aparato enzimático apropiado capaz de degradar proteínas y queratinas, de ahí su frecuente aparición en algunos mamíferos, incluyendo humanos.
- Los alcances de *Alternaria* son asombrosos, por lo que aún es necesario conocer sus mecanismos como elemento alérgeno y patógeno, estrategias de supervivencia y dispersión, así como su asociación con otros bioaerosoles y su sinergia con elementos pertenecientes a las PM_{2.5}.

Como conclusión final queda agregar, que se logró demostrar exitosamente que *Alternaria* posee una capacidad enzimática para penetrar y degradar medio con proteínas y queratinas, realizando así procesos complejos.

12. Literatura citada

Almaguer M y Rojas-Flores T I. 2013. Airborne culturable fungi of the atmosphere of Havana, Cuba. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 20: 35-45.

Andersen Z J, Bønnelykke K, Hvidberg M, Jensen S S, Ketzel M, Loft S, Sørensen M, Tjønneland A, Overvad K, Raaschou-Nielsen O. 2012. Long-term exposure to air pollution and asthma hospitalisations in older adults: a cohort study. *Thorax*, 67: 6–11.

Apodaca G, McKerrow J H. 1989. Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. *Infect Immun*, 57(10): 3081 – 90.

Apprich V, Spergser J, Rosengarten R, Stanek C. 2006. In vitro degradation of equine keratin by dermatophytes and other keratinophilic fungi. *Veterinary Microbiology*, 114:352 – 358.

Aroca E, Chahuán J, Cifuentes J, Mahuzier S, Sepúlveda M. 2007. Clasificación, descripción y biología de los dermatofitos. Dirigida por Marco Silva. *Curso de Microbiología y Parasitología*. [Consulta 2014-11-07] Disponible en internet: <http://hongosdermatofitos.blogspot.mx/>

Arteaga-Botello B. 2005. Estudios sobre la zona Metropolitana del Valle de Toluca. *Región y Sociedad*. 17: 33.

Barnett H L y B B Hunter. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi 4 ed. Mc Millan, ew York. pp 218.

Barrera-Becerra C, Bejarano-Rojas M D, Cortes-Martínez C, Fernández de la Mota E, Fernández-Santiago E, Lacida-Baro M, Llanes-Ruiz F, Pérez-Lozano M J, Pinilla-Muñoz J, Rivas-Aguayo D, Suárez-Alemán G. 2006. Estrategia para la seguridad del paciente. *Secretaría del Medio Ambiente, Consejería de Salud de Andalucía*, pp 92.

Barron G L. 1968. The genera of Hyphomycetes from soil. Robert Krieger Publish. Co. Florida. pp 364.

Bonifaz-Trujillo J A. 2012. Micología medica básica, Mc Graw Hill, Universidad Nacional Autónoma Metropolitana, 4 edi. Pp 570.

Bell A A y Wheeler M H. 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu Rev Phytopathol*, 24: 411 – 451.

Bond C T, Streets G D, Nelson M S, Woo J-H and Klimont Z. 2004. A technology-based global inventory of black and organic carbon emissions from combustion. *Journal of Geophysical Research*, pp 109.

Borja-Aburto V H, Loomis D P, Bangdiwala S I, Shy C M, Rascon-Pacheco R A. 1997. Ozone, Suspended particulates, and daily mortality in Mexico city. *American Journal of Epidemiology*, 145(3): 258 – 268.

Blackwell M. 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species. *Am. J. Bot.* 98: 426–438.

- Brasch J y Zaldua M.** 1994. Enzyme patterns of dermatophytes. *Mycoses*, 37: 11 – 16.
- Breitenback M, Simon B, Probst G, Oberkofler H, Ferrera F, Briza P.** 1997. Enolases are highly conserved fungal allergens. *Int Arch Allergy Immunol*, 113: 114-7.
- Caballero-Segura B., E. T. Romero-Guzmán, L. R. Reyes-Gutiérrez, M. José-Yacaman.** 2005. Bioaerosoles transportados por agua de lluvia en el valle de Toluca caracterizados por microscopia electrónica de barrido. *COMECyT*, EdoMex-CO1-09.
- Calderón C, Lacey J, McCartney A, Rosas I.** 1997. Influence of urban climate upon distribution of airborne Deuteromycete spore concentrations in Mexico city. *Int J Biometeorol*, 40: 71 – 80.
- CONAPO.** 2010. Proyecciones de la Población de los Municipios 2000-2030: CONAPO (2012). *Consejo Nacional de Población (2010)*, [Consulta 2015-03-04]. Disponible en internet: <http://www.conapo.gob.mx/micros/proymunloc/index.html>
- Cañedo V y Ames T.** 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. *Centro Internacional de la Papa (CIP)*, Lima, Perú. pp 62.
- Casadevall A.** 2012. Fungi and the rise of mammals. *PLoS. Pathog.* 8: 951. [Consulta 2016-03-31]. Disponible en internet: http://cdc.gov/hai/outbreaks/laboratory/lab_testing_results.html.
- Castellanos-Moguel J, Mier T, Reyes-Montes M del R, Navarro-Barranco H, Zepeda-Rodríguez A, Pérez-Torres A, Toriello C.** 2013. Fungal growth development index and ultrastructural study of whiteflies infected by three *Isaria fumosorosea* isolates of different pathogenicity. *Rev. Mex. Mic*, 38: 23– 33.
- Castellanos-Moguel J, Núñez-Cardona M T, Falcón-Bárceñas T, Díaz-Godoy R V.** 2007. Enemigos invisibles: Hongos y partículas en la atmósfera, efectos sobre la salud. *Entretextos*, Universidad Iberoamericana León, pp 6. [Consulta 2016-03-25] Disponible en internet: <http://entretextos.leon.uia.mx/num/14/PDF/E14-Art3.pdf>
- Chakraborty P, Chakraborty A, Ghosh D, Mandal J, Biswas S, Mukhopadhyay U K, Bhattacharya S G.** 2014. Effect of airborne *Alternaria conidia*, ozone exposure, PM10 and weather on emergency visits for asthma in school-age children in Kolkata city, India. *Aerobiologia*, 30: 137–148.
- Christensen M.** 1989. A view of fungal ecology. *Micology*, 81: 1 – 19.
- Clinica Universidad de Navarra.** 2013. Hongo dimórfico. Pamplona, España. [Consulta 2014-12-01] Disponible en internet: <http://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/hongo-dimorfico>
- Crous P W, Gams W, Stalpers J A, Cannon P F, Kirk P M, David J C, Triebel D.** 2004. «An online database of names and descriptions as an alternative to registration.» *Mycological Research*, 108:1236–1238. [Consulta 2016-03-01] Disponible en internet: <http://www.mycobank.org/>

- Das S y Gupta-Bhattacharya S.** 2008. Enumerating outdoor aeromycota in suburban West Bengal, India, with reference to respiratory allergy and meteorological factors. *Ann Agric Environ Med*, 15: 105 – 112.
- Dedola C, Stuart A P G, Ridyard A E, Else R W, Van den Broek A H M, Choiş J S, de Hoog G S, Thoday K L.** 2009. Cutaneous *Alternaria* infectoria infection in a dog in association with therapeutic immunosuppression for the management of immune-mediated haemolytic anaemia. *Veterinary Dermatology*, 21: 626–634.
- Denning D W, O’Driscoll B R, Hogaboam C M, Bowyer P, Niven R M.** 2006. The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence. *European Respiratory Journal*, 27: 615 – 626.
- Diario Oficial de la Federación (DOF).** 2014a. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana *NOM-025-SSA1-2014*. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 20 de agosto de 2014. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5357042&fecha=20/08/2014.
- Diario Oficial de la Federación (DOF).** 2014b. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana *NOM-020-SSA1-2014*. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 19 de agosto de 2014. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5356801&fecha=19/08/2014.
- Dye C, Johnson E M, Gruffydd-Jones T J.** 2009. *Alternaria* species infection in nine domestic cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11: 332-336.
- English H y Gerhardt F.** 1946. The effect of ultraviolet radiation on the viability of fungus spores and on the development of decay in sweet cherries. *Phytopathology*, 36: 100 – 111.
- Fuiano N, Fusilli S, Incorvaia C.** 2012. A role for measurement of nasal IgE antibodies in diagnosis of *Alternaria*-induced rhinitis in children. *Allergol Immunopathol, Published by Elsevier España*, 40(2):71-74.
- Frank V, Tánová G y Takácsová L.** 1993. Effects of cadmium and mercury on growth and differentiation of *Trichoderma viride*. *Zentralbl Mikrobiol.* 148: 229–232.
- Gauthier T, Wang X, Sifuentes Dos Santos J, Fysikopoulos A, Tadríst S, Canlet C, Artigot M P, Loiseau N, Oswald I P, Puel O.** 2012. Trypacidin, a spore-borne toxin from *Aspergillus fumigatus*, is cytotoxic to lung cells. *PLoS One*, 7(2).
- Galindo-Martínez A.** 2011. Identificación de propágulos fúngicos en zonas urbanas. Dirigida por María Judith Castellanos Moguel. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Laboratorio de Micología.
- García E.** 2004. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de *Köppen*, Serie Libros, núm. 6, Instituto de Geografía, UNAM, México.
- García Cortes V.** 2004. Introducción a la Microbiología. *EUNED segunda edic*, 91 – 92.

Gavela E, Ávila A, Sancho A, Molina P, Fernández-Nájera J E, Crespo J, Pallardó L M. 2006. Agregación cronológica de cuatro casos de micosis subcutánea invasiva en receptores de trasplante renal. *Nefrología*, 26: 4.

Giusiano G E. 2011. Micología General. *Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología*, 1 – 6.

Gobierno del Estado de México. 2010. Base de diagnóstico: Población Vulnerable del Estado de México 2010. Documento técnico DDA/04/2011, 5 – 7.

Gobierno del Estado de México. 2005. Plan Regional de Desarrollo Urbano del Valle de Toluca. Estado de México: Gobierno del Estado de México 2005. [Consulta 2016-03-25] Disponible en internet: http://seduv.edomexico.gob.mx/dgau/planes_regionales/prduvt/Doc%20PRDUVT.pdf

Gonzalo M A, Paredes M M, Muñoz A F, Tormo F, Silva I y Martínez J F. 1996. Estudio aeromicológico de la ciudad de Badajoz: Periodos de mayo a agosto de 1993 y 1994. *Rev. Esp. Alergol Immunol Clin*, 11: 188-194.

Gomes J, Vilarinho C, Duarte M L, Brito C. 2011. Cutaneous Phaeohyphomycosis Caused by *Alternaria alternata* Unresponsive to Itraconazole Treatment. *Case Reports in Dermatological Medicine*, 11: 4.

Gottwald T R, T M Trocine and L W Timmer. 1997. A computer controlled environmental chamber for the study of aerial fungal spore release. *Phytopathology*, 87: 1078-1084.

Gugnani H C. 2000. Nondermatophytic filamentous keratinophilic fungi and their role in human. *Revista Iberoamericana de Micología. Spain*, 109 – 114.

Gutiérrez-Bustillo A M. 2014. Esporas de Hongos, *Alternaria*. *Diater Laboratorios, Facultad de Farmacia de la U.C.M.*, 1 – 4. [Consulta 2014-11-06] Disponible en internet: <http://alcoi.san.gva.es/alercoy/fichas/Alternaria/Esporas%20de%20hongos-alternaria.pdf>

Gutiérrez-Reyes J, Romero-Guzmán E T, Reyes-Gutiérrez L R, Sandoval-Pérez A, Aguirre-Campuzano C E. 2009. Bioaerosoles depositados vía húmeda-seca en la zona Metropolitana del Valle de Toluca. *Contacto Nuclear*, Instituto de Investigaciones Nucleares (ININ), pp 8. [Consulta 2016-03-25]. Disponible en internet: <http://www.inin.gob.mx/publicaciones/documentospdf/CN%2058%20Bioaerosoles.pdf>

Grinn-Gofrón A and Rapiejko P. 2009. Occurrence of *Cladosporium* spp. and *Alternaria* spp. spores in Western, Northern and Central-Eastern Poland in 2004–2006 and relation to some meteorological factors. *Atmospheric Research*, 93: 747-758.

Grzywnowicz G, Lobarzewski J, Wawrzekiewicz K, Wolski T. 1989. Comparative characterization of proteolytic enzymes from *Trichophyton gallinae* and *Trichophyton verrucosum*. *J Med Vet Mycol*, 27: 319 – 328.

Henrici A T. 1930. Molds, yeasts and actinomycetes. New York, ed. 2 by C.E. Skinner, C.W. Emmons & H.M. Tsuchiya (1947).

Hernández-Calleja A. 2008. Agentes biológicos no infecciosos: enfermedades respiratorias. *Instituto Nacional de Seguridad e Higiene del Trabajo, Notas Técnicas de Prevención*, 802: 8.

Hogg B M. 1966. Microfungi on leaves of *Fagus sylvatica*. II. Duration of survival, spore viability and cellulolytic activity. *Trans Br Mycol Soc*, 49: 193 – 204.

Hyde K D, Gareth Jones E B, Jian-Kui L, Ariyawansa H, Boehm E, Boonmee S, Braun U, Chomnunti P, Crous P W, Dong-Qin D, Diederich P, Dissanayake A, Doilom M, Doveri F, Hongsanan S, Jayawardena R, Lawrey J D, Yan-Mei L, Yong-Xiang L, Lücking R, Monkai J, Muggia L, Nelsen M P, Ka-Lai P, Phookamsak R, Senanayake I C, Shearer C A, Suetrong S, Tanaka K, Thambugala K M, Wijayawardene N N, Wikee S, Hai-Xia W, Zhang Y, Aguirre-Hudson B, Alias S A, Aptroot A, Bahkali A H, Bezerra J L, Bhat D J, Camporesi E, Chukeatirote E, Gueidan C, Hawksworth D L, Hirayama K, De Hoog S, Ji-Chuan K, Knudsen K, Wen-Jing L, Xing-Hong L, Zou-Yi L, Mapook A, McKenzie E H C, Miller A N, Mortimer P E, Phillips A J L, Raja H A, Scheuer C, Schumm F, Taylor J E, Tian Q, Tibpromma S, Wanasinghe D N, Wang Y, Jian-Chu X, Yacharoen S, Ji-Ye Y, Zhang M. 2013. Families of Dothideomycetes. *Fungal Diversity*, 63 (1): 1 – 313.

Institute for Health Metric and Evaluation (IHME). 2014. Global Burden of Disease. Disponible en: <http://www.healthdata.org/research-article/global-burden-severe-periodontitis-1990-2010-systematic-review-and-meta-regression>

INEGI. 2010. Censo General de Población y Vivienda 2010: Población Total con Estimación por Entidad y Municipio, Según Edad [base de datos]. Instituto Nacional de Estadística y Geografía, [Consulta 2015-03-04]. Disponible en internet: www.inegi.gob.mx.

INEGI. 2010. Principales resultados del Censo de Población y Vivienda 2010. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Censo de Población y Vivienda, pp 10 [Consulta 2014-09-15]. Disponible en internet: http://www.inegi.gob.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/censos/poblacion/2010/princi_result/cpv2010_principales_resultadosl.pdf

INEGI. 2011. Cuentas económicas y ecológicas de México, 2005-2009. Instituto Nacional de Estadística y Geografía, pp 172 [Consulta 2014-09-15]. Disponible en internet: http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/derivada/economicas/medio%20ambiente/2009-09/SCEEM2005-2009.pdf

INEGI. 2014a. Cuentas económicas y ecológicas de México. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/boletines/boletin/comunicados/especiales/2014/febrero/comunica48.pdf>.

INECC y SEMARNAT. 2013. Informe Nacional de calidad del Aire. Coordinación General de Contaminación y Salud Ambiental. *Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático & Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales*. México. 2014, 43- 46.

Jacobson E. 2000. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev*, 13: 708 – 717.

- Jackson C R.** 1959. Symptoms and host-parasite relations of the *Alternaria* leafspot disease of cucurbits. *Phytopathology*, 49: 731 – 733.
- Kasprzyk, I., B. Rzepowska and M. Wasylów.** 2004. Fungal Spores in the Atmosphere of Rzeszów (South-East Poland). *Ann Agric Environ Med*, 11:285-289.
- Kilic M, D U Altintas, M Yilmaz, S Guneser Kendirli, G Bingol Karakoc, E Taskin, T Ceter, N M Pinar.** 2010. The effects of meteorological factors and *Alternaria* spore concentrations on children sensitized to *Alternaria*. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 38(3): 122-128.
- Koburger J A.** 1976. In compendium of methods for the microbiological examination of foods. Ed. Speck, M L Ch. 16, pp 225 - 229. Washington D C. American Public Health Association.
- Konidaris V, Mersinoglou A, Vyzantiadis T A, Papadopoulou D, Boboridis K G, Ekonomidis P.** 2013. Corneal Transplant Infection due to *Alternaria alternata*: A Case Report. *Case Reports in Ophthalmological Medicine*, pp 4.
- Landa Z, L Osborne, F López, J Eyal.** 1994. A bioassay for determining pathogenicity of entomogenous fungi on whiteflies. *Biological Control*, 4:341-350.
- Leslie J F and Summerell S B.** 2006. The *Fusarium* laboratory manual. First edition. Ed. Blackwell Publishing. Iowa, USA. pp 388.
- Linares J F, Gustafsson I, Baquero F, Martinez J L.** 2006. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103(51): 19484–19489.
- Lizaso M T, García B E, Gómez B., Zabalegui A, Rodríguez M J, Tabar A I.** 2003. Tratamiento de la alergia a hongos. *An. sis. sanit. Navar.*, 26, 2: 129-137.
- López-Jácome L E, Hernández-Durán M, Colín-Castro C A, Ortega-Peña S, Cerón-González G, Franco-Cendejas R.** 2014. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Artículo de revisión. Laboratorio de Infectología, Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados (CENIAQ), *Instituto Nacional de Rehabilitación*. 3: 10 – 18.
- López-Martínez R, Ruiz-Sánchez D, Huerta J G, Esquenaze A, Álvarez M T.** 1986. Variación estacional de hongos productores de alergia en el sur de la ciudad de México. *Allergol Immunopathol*, 1986, 14: 43 – 48.
- López-Martínez R I.** 2008. Introducción Importancia actual de la micología médica en México. *Gac Med Mex*, 144: 2.
- López-Urbina A A.** 2011. Presencia de *Cladosporium* y *Alternaria* en la zona urbana del Distrito Federal, relacionado con los niveles de IMECA (*Índice Metropolitano de la Calidad del Aire*). Dirigida por María Judith Castellanos Moguel. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Laboratorio de Micología.

Løwenstein H. 1983. Reporto on behalf of the International Union of Immunological Societies (I.U.I.S.) Allergen Standardization Subcommittee. *Arb Paul Ehrlich Inst*, 78: 41 – 48.

Maude R B y Humpherson-Jones F M. 1980. Studies on the seed-borne phases of dark leaf spot (*Alternaria brassicicola*) and gray leaf spot (*Alternaria brassicae*) of brassicas. *Ann Appl Biol*, 95: 311 – 319.

Maldonado-Vega M, Peña-Cabriales J J, De los Santos Villalobos S, Castellanos-Arévalo A P, Camarena-Pozos D, Arévalo-Rivas B, Valdés-Santiago L, Hernández-Valadez L J, Guzmán de Peña D L. 2014. Bioaerosoles y Evaluación de la Calidad del aire en dos centros hospitalarios ubicados en León, Guanajuato, México. *Rev Int Contam Ambie*, 30 (4): 351 – 363.

Manzano-Gayosso P. 2013. Dermatofitosis. Facultad de Medicina, UNAM, Departamento de Microbiología y Parasitología, Laboratorio de Micología Médica. [Consulta 2014-11-07] Disponible en internet: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/dermatofitosis.html>

Martínez-Hernandez M S. 2013. Evaluación de la sensibilidad a ketoconazol de *Cladosporium* spp. y *Alternaria* spp. aislados de la atmosfera de la Ciudad de México. Dirigida por María Judith Castellanos Moguel. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Laboratorio de Micología.

Meevootisom V, Niederpruem D J. 1979. Control of exocellular proteases in dermatophytes and especially *Trichophyton rubrum*. *Sabouraudia*, 17(2): 91–106.

Mier T, Toriello C y Ulloa M. 2002. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de laboratorio. División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco y el Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria.

Mimura T, Yamagami S, Fujishima H, Noma H, Kamei Y, Goto M, Kondo A, Matsubara M. 2014. Sensitization to Asian dust and allergic rhinoconjunctivitis. *Environmental Research*, 132: 220–225.

Minguela-Puras A, Moya-Quiles MR. 2005. Tipos de reacciones de hipersensibilidad. *Alergomurcia*. [Consulta 2014-12-01] Disponible en Internet: http://www.alergomurcia.com/pdf/librorinitis/Rinitis_Cap_05.pdf

Mitakakis T Z, Clift A y McGee P A. 2001. The effect of local cropping activities and weather on the airborne concentration of allergenic *Alternaria* spores in rural Australia. *Grana*, 40 (4): 230 – 239.

Murray P R, Rosenthal K S, Pfaller M A. 2009. Clasificación, estructura y replicación de los hongos. *Microbiología Médica sexta edic.* 63 – 65.

Mycobank data base. 2016. International Mycological Association (IMA), © Copyright 2016. Website built using BioloMICS Software. [Consulta 2016-04-20] Disponible en Internet: <http://www.mycobank.org>

Nakasone K K, Peterson S W, Jong S-C. 2004. Preservation and distribution of Fungal cultures. *Biodiversity of Fungi*. pp 37-47.

Navarro-Espinel J M. 1992. Familia de genes de caracterización y la queratina 6: caracterización y regulación. Dirigida por José Luis Jorcano Noval. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Biología, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

NEIKER. 2014. *Alternariosis* de la patata. *NEIKER-tecnalia, Instituto Publico de Investigación y Desarrollo Tecnológico*. España, pp 2 [Consulta 2014-09-15]. Disponible en internet: <http://www.avisosneiker.com/c/enfermedades/alternariosis/>

NHLBI. 2012. Asma. *The National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI)*, Department of Health and Human Services, USA gov. [Consulta 2014-11-13] Disponible en internet: <http://www.nhlbi.nih.gov/health-spanish/health-topics/temas/asthma/>

Nolla J A B. 1927. A new *Alternaria* disease of onions (*Allium cepa* L.). *Phytopathology*, 17: 115 – 132.

NOM-025-SSA1- 2014 Salud ambiental. Salud ambiental. Valores limite permisibles para la concentración de particulas suspendidas PM₁₀ y PM_{2.5} en el aire y criterios para su evaluación. Norma Oficial Mexicana. México, CDMX. DOF: 20/08/2014. [Consulta 2014-08-20] Disponible en internet: <http://www.medioambiente.oaxaca.gob.mx/wp-content/uploads/2017/09/NOM-025-SSA1-2014-PM10.pdf>

O'gorman C M y Fuller H T. 2008. Prevalence of culturable airborne spores of selected allergenic and pathogenic fungi in outdoor air. *Atmospheric Environment Science*, 42: 4355-4368.

Oliveira C M, Warren M H, Pierre C, Jeffrey W K. 2006. Variations in D/H and D/O from New Far Ultraviolet Spectroscopic Explorer Observations. *Astrophysical Journal*, 642: 283 – 306.

OMS. 2005. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3a ed. *World Health Organization*, Ginebra Suiza. [Consulta 2015-03-04] Disponible en internet: http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf

OMS. 2005. Guías de Calidad del aire de la OMS, relativas al material particulado, el ozono, el dióxido de nitrógeno y el dióxido de azufre. *World Health Organization*, Ginebra Suiza, 7 – 12. [Consulta 2014-11-06] Disponible en internet: http://www.who.int/phe/health_topics/outdoorair_aqg/es/

OMS. 2014. Public health, environmental and social determinants of health (PHE). *World Health Organization*. [Consulta 2014-11-06] Disponible en internet: http://www.who.int/phe/health_topics/outdoorair/databases/en/

Palacio A and Cuétara M S. 2009. Infecciones por hongos invasores en imágenes. *Ars Medical, Micología Medica*, España, pp 96.

- Parke J, Pscheidt J, Regan R, Hedberg J, Grunwald.** 2008. Curso de *Phytophthora* en la red: Capacitación para viveristas. Department of Agriculture, USDA Natural Resources Conservation Service. [Consulta 2014-11-06] Disponible en internet: <https://courses.ecampus.oregonstate.edu/phytophthora/espanol/index.html>
- Perera L, Li L, Darden T, Monroe D M, Pedersen L G.** 1997. Prediction of solution structures of the Ca²⁺-bound gamma- carboxy-glutamic acid domains of protein S and homolog growth arrest specific protein 6: use of the particle mesh Ewald method. *Biophys J*, 73: 1847 – 1856.
- Pérez Cárdenas J E.** 2005. Aspectos actuales sobre las dermatofitosis y sus agentes etiológicos. *Biosalud*, 14: 105 – 121.
- Pontón J, Moragues D M, Gané J, Guarro J, Quindós G.** 2002. Hongos y Actinomicetos Alergénicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 19-22.
- PROAIRE.** 2012. Aire Limpio: ProgRAMAT para Mejorar la Calidad del Aire del Valle de Toluca (2012-2017). SEDAGRO. Metepec, Estado de México, 23 – 30.
- PROAIRE.** 2007. Aire Limpio: ProgRAMAT para Mejorar la Calidad del Aire de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca (2007-2011). Dirección General de Prevención y Control de la Contaminación Atmosférica-SMAGEM, pp 225.
- Ramos-e-Silva M, Oliveira-Lima C M, Casz-Schechtman R, Moritz-Trope B, Carneiro S.** 2010. Superficial mycoses in immunodepressed patients (AIDS). *Clinics in Dermatology*, 28: 217 – 225.
- Rendueles B E.** 2015. Importancia del conocimiento de las esporas atmosféricas en zonas urbanas y su relación con la morbilidad por asma. Ponencia presentada en el XIII Congreso Español de Salud Ambiental, Rev. Salud ambient, 15(Espec. Congr.): 12-64.
- Rizzi L L, M P Sauli and P Ganis.** 2009. Seasonal ocurrence of *Alternaria* (1993–2004) and *Epicoccum* (1994–2004) spores in Trieste (NE Italy). *Ann Agric Environ Med*, 16: 63-70.
- Rocha-Estrada A, Alvarado-Vázquez M A, Gutiérrez-Reyes R, Salcedo-Martínez S M y Moreno-Limón S.** 2013. Variación temporal de esporas de *Alternaria*, *Cladosporium*, *Coprinus*, *Curvularia* y *Venturia* en el aire del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México. *Rev. Int. Contam. Ambient*, 29(2): 155-165.
- Rodríguez Orozco A R, Ruiz Reyes H, Sánchez Nafarrate S.** 2009. Efecto de la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* sobre el crecimiento de algunos hongos alergénicos aislados de pacientes con rinitis alérgica. *Rev Mex de Micol*, 29: 43 – 50.
- Romero M.** 2011. Recuperación de la Fracción Fúngica Asociada a la Fracción Respirable del Material Particulado en dos Sectores de la Región Metropolitana. Dirigida por Margarita Carú. Tesis de Maestría. Universidad de Chile, 2011.
- Romero-Valdez J G, Pereira Q, Atilio-Zini R, Canteros G E.** 2007. Reacciones de Hipersensibilidad. *Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina*, 167: 6.

- Romo A, Fernández G, Rodríguez J L, Silva J M.** 2009. Lesión cutánea inespecífica en una mujer embarazada de 17 años de edad. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27(3):189–190.
- Rosas I, Calderón C, Martínez L, Ulloa M, Lacey J.** 1997. Indoor and outdoor airborne fungal propagule concentrations in Mexico city. *Aerobiologia*, 13: 23 – 30.
- Rosas I, A Cravioto y E Ezcurra.** 2004. Microbiología ambiental, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Universidad Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología.
- Rotem J.** 1968. Thermoxerophitic properties of *Alternaria porri* f.sp. *solani*. *Phytopathology*, 58: 1284 – 7.
- Rotem J.** 1994. The genus *Alternaria*. Biology, Epidemiology, and Pathogenicity. *The American Phytopathological Society*, 1994, 1 – 6.
- Rubio-Calvo M, Rezusta A, Gil T J.** 2001. Infecciones oculares por el genero de *Alternaria*. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Control de Calidad*. Servicio Microbiología, Hospital Clínico Universitario de Zaragoza y Laboratorio de Microbiología, Hospital San Jorge de Huesca, pp 4.
- Ruiz-Camps I, Aguado J M, Almirante B, Bouza E, Ferrer-Barbera C, Len O, López-Cerero L, Rodríguez-Tudela J L, Ruiz M, Solé A, Vallejo C, Vázquez L, Zaragoza R, Cuenca-Estrella M, Grupo de Estudio de Micología Médica de la SEIMC (GEMICOMED).** 2010. Recomendaciones sobre la prevención de la infección fúngica invasora por hongos filamentosos de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 28: 3:172–172.
- Ruiz S S, De la Guardia Guerrero D C and Sánchez F A.** 2004. Estudio aerobiológico de los conidios de *Alternaria* y *Cladosporium* en la atmósfera de la ciudad de Almería (SE de España). *Rev Iberoam Micol*, 21: 121-127.
- Rusel R C.** 1958. Longevity studies whit wheat seed and certain seed-borne fungi. *Can J Plant Sci*, 38: 29 – 33.
- Sáenz de Santamaría M, Postigo I, Gutierrez-Rodríguez A, Cardona G, Guisantes JA, Asturias J, Martínez J.** 2006. The major allergen of *Alternaria alternata* (Alt a 1) is expressed in other members of the Pleosporaceae family. *Mycoses*, 9: 91 – 5.
- Sáenz-Lain C. y Gutiérrez-Bustillo M.** 2003. Esporas atmosféricas en la Comunidad de Madrid. *Documentos Técnicos de Salud Pública* 3, pp 83.
- Sabariego-Ruiz S, De la Guardia-Guerrero D C and Sánchez F A.** 2004. Estudio aerobiológico de los conidios de *Alternaria* y *Cladosporium* en la atmósfera de la ciudad de Almería (SE de España). *Rev Iberoam Micol*, 21: 121-127.
- Salido-Vallejo R, Linares-Sicilia M J, Garnacho-Saucedo G, Sánchez-Frías M, Solís-Cuesta F, Gené J, Moreno-Giménez J C.** 2014. Subcutaneous phaeohyphomycosis due to *Alternaria* infectoria in a renal transplant patient: Surgical treatment with no long-term relapse. *Rev Iberoam Micol, Published by Elsevier España*, 31(2):149–151.

Sánchez Monedero M A, Aguilar M I, Fenoll R, Roig A. 2007. Generación de bioaerosoles en estaciones depuradoras de aguas residuales. *Artículo de divulgación*, 37 – 42.

Sánchez-Espinosa K C y Almaguer-Chávez M. 2014. Aeromycology and human health. *Rev. Med. Tropical*, 67(3). [Consulta 2015-03-25] Disponible en internet: <http://www.revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/45/33>

Secretaría del Medio Ambiente. 2014. Características de los Contaminantes: Partículas Suspendidas Totales (PST), Menores a 10 Micras (PM10) y Menores a 2.5 Micras (PM2.5). *Red Automática de Monitoreo Atmosférico de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca. Gobierno de Estado de México.* [Consulta 2014-12-01] Disponible en internet: http://portal2.edomex.gob.mx/RAMAT/contaminacion_atmosferica/caracteristicas_contaminantes/index.htm

Sečnicková Z, Jůzlová K, Vojáčková N, Kazakov D V, Hošková L, Fialová J, Džambová M, Hercogová J. 2014. The rare case of *Alternaria alternata* cutaneous and pulmonary infection in a heart transplant recipient treated by azole antifungals. *Dermatologic Therapy*, 27: 140–143.

Silva-Barreto S, Vilela-de-Rezende D, Bassay-Blum L E. 2011. Fungos em sementes de plantas ornamentais. *Revista Brasileira de Sementes*, 33: 561 – 573.

SINAVIMO. 2010. *Alternaria solani*. Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas, Argentina. [Consulta 2014-09-15] Disponible en internet: <http://www.sinavimo.gov.ar/plaga/alternaria-solani>

Simmons E G. 2007. *Alternaria* an identification manual. *Fungal Biodiversity Centre*, 5 – 10.

Simpanya M F y Baxter M. 1996. Isolation of fungi from pelage of cats and dogs using the hairbrush technique. *Mycopathologia*, 134:129–133.

Singh S M, Naidu J, Pouranik M. 1990. Ungual and cutaneous phaeohyphomycosis caused by *Alternaria alternata* and *Alternaria chlamydospora*. *J Med Vet Mycol*, 28: 275 – 278.

Solé O M. 2004. Caracterización morfológica y molecular de hongos queratinofílicos: el orden onygenales. Dirigida por J.F. Cano. Tesis Doctoral. Universitat Rovira i Virgili, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques Unitat de Microbiologia. pp.37.

Song Baek Cho. 2005. Manual del Cultivador de Hongos I. Cultivo del hongo ostra. *Mush World*© All rights reserved. pp 1 – 4.

Shakurnia A H, Assarenhzadegan M A, Amini A, Shakerinejad G I. 2013. Prevalence of Fungal Allergens in Respiratory Allergic Patients in Ahvaz City, Southwest Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology, Published by Kowsar Corp.*, 6: 4.

Sharma R, Deval R, Priyadarshi V, Gaur S N, Singh V P, Singh A B. 2011. Indoor fungal concentration in the homes of allergic/asthmatic children in Delhi, India. *Allergy & Rhinology*, 2(1): 21–32.

Srinivasan P, Abraham E G, Ghosh A K, Valenzuela J, Ribeiro J M, Dimopoulos G. 2004. Analysis of the *Plasmodium* and *Anopheles* transcriptomes during oocyst differentiation. *J Biol Chem.*, 279:5581 – 5587.

Tehnologija Hrane. 2012. Rod *Alternaria*. *Mikrobiologija hrane*. [Consulta 2014-11-13] Disponible en internet: <http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija-2/rod-alternaria>

Téllés-Rojo M M, Romieu I, Ruiz-Velasco S, Lezana M A, Hernández-Avila M M. 2000. Daily respiratory mortality and PM10 pollution in Mexico City: importance of considering place of death. *Eur Respir J*, 16: 391 – 396.

Tsuboi K, Tamura T, Kuwahara K. 1989. Numerical study of vortex-induced vibration of circular cylinder in high-Reynolds-number flow. *AIAA paper 89-0294*.

Vanzzini Z V, Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Méndez-Toval L J, Gómez-Leal A, López-Martínez R. 2010. QueratOMICOSIS en un centro de atención oftalmológica en la Ciudad de México. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27 (2): 57 – 61.

Viani F C, Santos J I D, Paula C R, Larson C E, Gambale W. 2001. Production of extracellular enzymes by *Microsporium canis* and their role in its virulence. *Medical Mycology*, 39: 463 – 468.

Viviani M A, Tortorano A M, Laria G, Giannetti A, Bignotti G. 1986. Two new cases of cutaneous alternariosis with a review of the literature. *Mycopathologia*, 96:3 – 12.

Von Arx J A. 1981. The genera of fungi sporulating in pure culture. Gartner Verlag, Berlín. pp 424.

Wadhvani K, Shrivastava A K. 1985. Some cases of onychomycosis from North India in different working environments. *Mycopathologia*, 92: 145 - 155.

Werner Greuter & Rosa Rankin Rodríguez. 2013. Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas (ICBN). Ed. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 248 pp.

WHO. 2012. Global Health Observatory Data Repository; Burden of disease; deaths, 2008. *World Health Organization*. [Consulta 2014-09-15] Disponible en internet: <http://apps.who.int/ghodata/?vid=34300>

Woolhouse M and Gaunt E. 2007. Ecologic origins of novel human pathogens. *Crit. Rev. Microbiol.* 33: 231–242.

Zebeldia J M, Jáuregui I, Baeza L M, Senent C J. 2012. Enfermedades alérgicas de la fundación BBVA. *Fundación BBVA*, Bilbao, pp 487.