



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**Identificación molecular de hongos con base en la región
ribosomal de DNA (ITS) en mastitis granulomatosa
idiopática**

TRABAJO DE TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

CARLOS DAVID ROSAS ROBLES

ASESOR: DRA. VIRGINIA SÁNCHEZ MONROY

COASESOR: M. EN C. MARITERE DOMÍNGUEZ ROJAS

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO. 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Identificación molecular de hongos con base en la región ribosomal de DNA (ITS) en mastitis granulomatosa idiopática.

Que presenta el pasante: **Carlos David Rosas Robles**

Con número de cuenta: 311119129 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 29 de agosto de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
SECRETARIO	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/javg

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Biomedicina Molecular I de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional bajo la asesoría de la Dra. Virginia Sánchez Monroy.

Agradecimientos Personales

♥ *A mis padres:*

Por todo el apoyo que me brindaron, sin importar las circunstancias en las que nos encontrábamos, siempre buscando la manera de sacarnos adelante. Por ser ese pilar que no se derrumba. Por enseñarme siempre a luchar por lo que quiero y a no rendirme nunca. Gracias por ser los peores papás del mundo porque gracias a eso su hijo se va a titular.

♥ *A Raúl:*

Por estar en esas noches de desvelo haciéndome compañía y jamás dejarme, por esos momentos en que sentía que me derrumbaba siempre estuviste para hacerme ver lo divertido de las cosas.

♥ *A mi abuelito Chavín:*

Por nunca dejarme solo, aunque no estuvo físicamente siempre estuvo apoyándome desde la distancia, por ser mi motivación personal, por eso y más.

♥ *A mi abuelita Adela:*

Por ser parte importante de mi desarrollo académico y personal, por desvelarse para esperar a que llegáramos, por preocuparse por nosotros y seguirlo haciendo hasta la fecha.

♥ *A Ana:*

Por ser la mayor motivación en mi vida, por brindarme tu apoyo y comprensión en todo momento, te agradezco tu paciencia y regaños que sin ellos y sin tu amor, esto no habría sido posible. Por compartir metas y sueños. Gracias por no soltar de mi mano.

♥ *A mis amigos:*

Por acompañarme a lo largo de este trayecto, ayudándome a crecer como compañero y como persona, agradezco especialmente a Valeria, Omar y David, por no juzgarme y por estar conmigo en toda ocasión.

♥ *A la Dra. Virginia y a la M. en C. Maritere*

Por ayudarme en una situación difícil. Gracias a su exigencia, enseñanza y asesoramiento.

♥ *A mis sinodales:*

A la Dra. Sandra Diaz, el Dr. Salvador Fonseca, la LBD. Larisa González y el QFB. Alejandro Gutiérrez, por su tiempo, por la enseñanza y seguimiento brindado a lo largo de la carrera.

♥ *A la UNAM:*

Por haberme proporcionado un lugar entre sus filas y ofrecerme una amplia variedad de oportunidades para desarrollarme profesionalmente, por todas las puertas que abre, tanto nacional como internacionalmente. Por todas las personas que conocí, amigos y profesores.

Gracias a todos por ser parte fundamental de este proceso que no termina aquí, es tan solo el comienzo.

I. Abreviaturas

DNA. Deoxyribonucleic acid (Acido desoxirribonucleico)

NADPH. Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

MGI. Mastitis Granulomatosa Idiopática

ITS. Internal Transcribed spacer (espaciador interno del transcrito)

PCR: Polimerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

ROS. Reactive Oxygen Species (Especies reactivas de oxígeno)

IL. Interleucina

INF. Interferón

TNF. Tumor Necrosis Factor (Factor de necrosis tumoral)

NET. Neutrophil extracellular traps (Trampas extracelulares de neutrófilos)

ÍNDICE

I.	ABREVIATURAS	5
II.	ÍNDICE DE FIGURAS	8
III.	ÍNDICE DE TABLAS	9
IV.	RESUMEN	10
V.	INTRODUCCIÓN	12
VI.	ANTECEDENTES	14
VII.	MARCO TEÓRICO	17
	1. Proceso de formación del granuloma	18
	2. Fisiopatología de la mastitis granulomatosa idiopática	23
	3. Manifestaciones clínicas	23
	4. Estudios de diagnóstico	24
	5. Estudios de apoyo al diagnóstico	26
	5.1 Diagnóstico molecular	26
	6. Estudios de gabinete	26
	7. Diagnóstico diferencial	28
	8. Tratamiento	28
VIII.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
IX.	JUSTIFICACIÓN	30
X.	HIPÓTESIS	31
XI.	OBJETIVOS	31
	1. Objetivo general	31
	2. Objetivos específicos	31
XII.	MATERIAL Y MÉTODOS	32
	1. Esquema general de trabajo	32
	2. Diseño	33

3.	Población de estudio	33
4.	Muestreo	33
5.	Criterios de selección de la población	33
	5.1 Criterios de inclusión	33
	5.2 Criterios de exclusión	33
	5.3 Criterios de eliminación	33
6.	Variables	34
7.	Obtención de muestras	34
	7.1 Determinación de la integridad de las muestras de	35
	7.2 Amplificación del control endógeno	35
	7.3 Amplificación de la región ITS	35
	7.4 Secuenciación	37
	7.5 Análisis bioinformático	39
	7.6 Análisis estadístico	39
XIII.	RESULTADOS	40
	1. Determinación de la integridad del DNA	42
	2. Amplificación del control endógeno	43
	3. Amplificación de la región ITS	44
	4. Secuenciación	45
	5. Análisis bioinformático y estadístico	46
XIV.	DISCUSIÓN	50
XV.	CONCLUSIONES	54
XVI.	PERSPECTIVAS	55
XVII.	REFERENCIAS	56

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica de la región ITS del material genético de los hongos	17
Figura 2. Formación de un granuloma	21
Figura 3. Esquema General de trabajo	32
Figura 4. Electroforesis representativa correspondiente a la determinación de la integridad	42
Figura 5. Electroforesis representativa correspondiente a la amplificación del control endógeno	43
Figura 6. Electroforesis representativa correspondiente a la amplificación de la región ITS	44
Figura 7. Electroferograma representativo obtenido posterior a la secuenciación empleando la herramienta bioinformática BIOEDIT	45
Figura 8. Alineamiento representativo obtenido mediante la plataforma BLAST de NCBI	46
Figura 9. Frecuencia de los géneros fúngicos encontrados en las muestras de estudio	47

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la MGI basada en la presentación clínica.	14
Tabla 2. Casos de mastitis causadas por <i>Mycobacterias</i> reportados en la literatura	15
Tabla 3. Clasificación de BI-RADS	27
Tabla 4. Variables dependientes e independientes	34
Tabla 5. Oligonucleótidos específicos para la región ITS de hongos	36
Tabla 6. Composición de la mezcla de reacción para la PCR de Hongos	36
Tabla 7. Condiciones de termociclado para la amplificación de la región ITS del DNA	36
Tabla 8. Mezcla de reacción para la purificación de productos obtenidos por PCR	37
Tabla 9. Condiciones de termociclado para la purificación de los productos obtenidos por PCR	37
Tabla 10. Mezcla de reacción para la PCR de secuencia	38
Tabla 11. Condiciones de termociclado para la PCR de secuencia	38
Tabla 12. Características demográficas y clínicas de la población	40
Tabla 13. Hongos identificados en las muestras	47
Tabla 14. Determinación de la significancia estadística de la relación entre hongo presente y manifestación clínica	48

IV. RESUMEN

La Mastitis granulomatosa idiopática (MGI) se establece como una identidad inflamatoria benigna crónica y poco frecuente del seno, se caracteriza por la formación de abscesos y granulomas, que a su vez pueden ser confundidos con carcinomas. Esta afección fue descrita por primera vez por Kessler en 1972, como un proceso inflamatorio crónico que compromete en mayor grado al estroma de la glándula mamaria y con frecuencia se forma fístulas. El diagnóstico clínico se confunde con cáncer de mama localmente avanzado.

La etiología es desconocida mientras que sus manifestaciones clínicas y el mecanismo de formación del granuloma observado en el estudio histopatológico muestra una posible afección de los mecanismos fisiopatológicos relacionados con el sistema inmunitario.

No existe consenso sobre el tratamiento ideal para la mastitis granulomatosa idiopática. La ausencia de estudios prospectivos, producto de la baja incidencia de esta enfermedad, no permite hasta la fecha obtener conclusiones definitivas al respecto, por lo que existe un alto índice de recaídas, deformidades de la mama y afecciones psicológicas.

El objetivo de este estudio fue el de identificar hongos en biopsias provenientes de pacientes con Mastitis Granulomatosa Idiopática mediante técnicas de biología molecular y evaluar su asociación con la presentación clínica para mejorar el tratamiento dirigido y reducir el índice de recidivas.

Se realizó un estudio tomando en cuenta 56 muestras de DNA de biopsias diagnosticadas con Mastitis Granulomatosa Idiopática en búsqueda de hongos, esto fue mediante la amplificación de la región ITS y su posterior secuenciación. La identificación se llevó a cabo a través de los electroferogramas y su análisis en la herramienta bioinformática BIOEDIT y BLAST de NCBI. Para la evaluación de la relación entre la presencia de hongos en la muestra y las manifestaciones clínicas se realizaron pruebas cruzadas en el programa SPSS. Logrando identificar hongos con ayuda de técnicas moleculares. Se detectaron 17 muestras positivas a la presencia de los microorganismos propuestos de un total de 56. La mayoría de las muestras exploradas corresponden a *Penicillium sp.* con un 59.09%, mientras que

los hongos incultivables representan un 9.09%. Esto nos indica que existe un predominio del género *Penicillium*, Por una posible reacción cruzada con penicilinas semisintéticas.

La principal limitación del estudio fue que, al ser un estudio retrospectivo, la información clínica de algunos casos estaba incompleta, complicando el análisis de las muestras lo cual mejoraría significativamente la realización de un estudio prospectivo.

Los resultados nos orientan sobre la posibilidad que en estas pacientes exista alguna mutación parcial en los componentes del sistema NADPH provocando a su vez que el organismo sea incapaz de eliminar microorganismos patógenos. Por esta razón habría que identificar si la presencia de estas mutaciones explica la formación del granuloma en las pacientes con MGI.

V. INTRODUCCIÓN

El término mastitis se define como el proceso inflamatorio de las mamas, esta inflamación puede o no implicar una infección, entre ellas se distinguen las agudas (neonatal y puerperal) y crónicas las cuales pueden ser: Con manifestación tumoral; a) Granulomatosa, b) Crónica residual, c) diabética, d) esclerosante, e) necrosis grasa, f) galactocele. De la placa mamilar; a) absceso subareolar, b) galactoforitis, c) ectasia ductal y d) fístulas de ductos. Con afección cutánea; a) absceso espontáneo, b) enfermedad de Mondor, c) radiodermatitis y d) mastitis actínica (Martín, & Álvaro, 2001; Pérez, 2002).

De acuerdo a su causa la mastitis granulomatosa se puede clasificar a su vez en: inespecífica o idiopática (Causa desconocida) y específica (Agente etiológico conocido tuberculosis, sífilis, actinomicosis, sarcoidosis, parasitosis y micosis) (Pérez, 2002).

La Mastitis granulomatosa idiopática (MGI) se establece como una identidad inflamatoria benigna crónica y poco frecuente del seno, se caracteriza por la formación de abscesos y granulomas, que a su vez pueden ser confundidos con carcinomas. Esta afección fue descrita por primera vez por Kessler en 1972, como un proceso inflamatorio crónico que comprometen en mayor grado al estroma de la glándula mamaria y con frecuencia forman fístulas. En el diagnóstico clínico, se confunde con cáncer de mama localmente avanzado (Barrero, *et al.*, 2005; Kessler & Wolloch, 1972; Pérez, Villaseñor, *et al.*, 2012; Vargas, 2014).

La limitante central de esta etiología radica en la dificultad para emitir un diagnóstico y tratamiento, debido a la ausencia de un consenso mundial, para su atención. Una vez descartada la existencia de carcinoma por el departamento de oncología y diagnosticada como MGI es tratada empíricamente por desconocerse la causa, lo que en la mayoría de las ocasiones presenta fallas en el tratamiento o recaídas a corto o mediano plazo, que a su vez provoca deformaciones.

En este sentido la etiología se ha atribuido a múltiples causas como procesos autoinmunes, desequilibrios hormonales, agentes infecciosos incluyendo la asociación con bacterias de difícil crecimiento en cultivo (Moris, Damaskos, *et al.*, 2017).

Como etiología probable se ha planteado una alteración de sistema inmune innato provocando una inflamación crónica granulomatosa que es un patrón de inflamación característico de hipersensibilidad tipo IV y ocurre cuando determinados antígenos son persistentes o no degradables por la incapacidad de los fagocitos para generar especies reactivas de oxígeno por alteración en el funcionamiento del sistema NADPH, lo que conlleva la formación de granulomas y otras manifestaciones clínicas(Gutiérrez, 2017).

VI. ANTECEDENTES

La MGI es una patología benigna de la mama sin un factor etiológico conocido hasta el momento. Su diagnóstico es por exclusión y debido a la ausencia de manifestaciones específicas, se requiere de un alto grado de sospecha, ya que puede simular clínica y radiológicamente a un carcinoma mamario (Pérez, Carpio, & Gac, 2002). En un estudio realizado por Rami Yaghan (2019) se propone una clasificación para la mastitis granulomatosa idiopática que provee de pistas terapéuticas y ayuda a la predicción de la recurrencia. La característica principal de la clasificación se basa en el grado de inflamación y en la presencia o ausencia de hallazgos extramamarios; se establecieron cuatro distintos patrones (Yaghan, 2019).

Tabla 1. Clasificación de la MGI basada en la presentación clínica patrones (Yaghan, 2019)

	Patrón A	Patrón B	Patrón C	Patrón D
Principales características de clasificación	Masa: sin dolor, sin inflamación	Masa: + dolor, + inflamación	Como abscesos	Masa: +úlceras o fístula
Número de pacientes	9 (13.23%)	36 (52.94%)	18 (26.47%)	5 (7.35%)
Dolor asociado	No	Medio a moderado	Severo	Moderado
Inflamación local	No	Medio a moderado	Severo	Severo
Eritema nodoso	-	1 paciente	2 pacientes	-
Recurrencia	0 (00%)	8 (22.20%)	9 (50%)	2 (40%)
Tratamiento esteroideo	0 (00%)	10 (27.78%)	16 (88.90%)	3 (60%)
Hallazgos operatorios	Masa dura	Masa dura	Masa dura, + pus, identificación de margen difícil	Masa ulcerativa, + pus

Hasta el momento no se ha encontrado un tratamiento efectivo en virtud de que no se conoce la causa. Se han realizado diversos estudios en busca de esta última, en los últimos años ya existen varios reportes de estudios en diferentes partes del mundo donde han encontrado asociación entre a mastitis granulomatosa diagnosticada como idiopática y la presencia de bacterias entre los cuales podemos mencionar el realizado por Johnstone en Australia realizado de enero del 2010 a junio del 2015 donde describe 15 casos de mastitis lobular granulomatosa con

evidencia de *Corynebacterium spp.* mediante secuenciación del gen 16S rRNA de muestras obtenidas ya sea por cirugía o por aspiración con aguja fina (Johnstone, *et al.*, 2017). Otro estudio más, realizado en Dinamarca en 2016 se realizó un análisis metagenómico en las muestras de 19 pacientes encontrando la presencia de *Corynebacterium* en todos los casos y en 11 de los 19 casos se confirmó *Corynebacterium kroppenstedtii* (Hai-jing, *et al.*, 2016). También existe un informe de un caso reportado en China en el 2016, donde se describe un aislamiento de *Mycobacterium abscessus* en el tejido mamario de una paciente con diagnóstico de mastitis lobulillar granulomatosa (Yaghan, 2019; Wang, *et al.*, 2017). De igual forma, existen otros casos en diversas partes del mundo se han encontrado micobacterias, como se muestra en la siguiente tabla. (Tabla 2).

Tabla 2. Casos de mastitis causadas por *Mycobacterias* reportados en la literatura (Gutierrez, 2017).

Caso	Autor y año	Edad y sexo	Población	Presentación	Cirugía	Microorganismo	Tiempo de terapia	Resolución
1	Trupiano 2001	17/f	América	Masa	Resección	<i>M. abscessus</i>	Ninguna	Respuesta completa
2	Jacobs 2002	35/f	Alemania	Masa	Biopsia escisional	<i>M. holsaticum</i> <i>M. agricund</i> <i>M. brumae</i>	10 días	Respuesta completa
3	Lewis 2004	29/f	América	Masa	Biopsia incisional y escisional	<i>M. fortuitum</i>	6 meses	Respuesta completa
4	Bengualid 2008	17/f	América	Absceso	Incisión drenaje y	<i>M. fortuitum</i>	6-12 meses	Recaída después de 3 meses
5	Yasar 2011	38/f	Turquía	Masa	Biopsia con aguja fina	<i>M. abscessus</i>	4 meses	Respuesta completa
6	Betal 2011	51/f	Caucasicos	Abscesos	Incisión drenaje y	<i>M. fortuitum</i>	6 meses	Respuesta completa
7	Abbass 2014	21/f	Canadá	Masa	Aspiración	<i>M. fortuitum</i>	6 meses	Respuesta completa
8	Ye-Sheng Wang 2016	29/f	China	Masa	Biopsia incisional y escisional	<i>M. abscessus</i>	1 año	Respuesta completa

Posteriormente en 2017 fue presentado en la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del IPN el trabajo especial de grado “Identificación molecular de bacterias basado en el 16S ribosomal

en casos de mastitis granulomatosa idiopática y resultados en su abordaje clínico” presentado por Gutierrez Bravo, María Vianey (Gutierrez, 2017).

Esta investigación tuvo como objetivo la identificación de bacterias en tejido con diagnóstico de MGI mediante el uso de técnicas de biología molecular para poder llevar a cabo la evaluación de su asociación con la presentación clínica, radiológica e histopatológica, así como la influencia en los resultados y su abordaje terapéutico. Esto surge a partir de la evidencia de la asociación de esta patología con la existencia de bacterias que no se logran identificar por medio de métodos convencionales.

El planteamiento anterior permitió el uso de tejido de biopsia conservado en parafina para la extracción de DNA, el cual fue utilizado para la identificación bacteriana mediante PCR de la subunidad 16S y su posterior secuenciación, obteniendo que 52 de las 57 muestras fueran positivas, indicando una prevalencia bacteriana del 91%. La identificación molecular reveló porcentajes de identidad entre el 88 y 100%. Arrojando que la frecuencia de los géneros fue de 82% de bacterias no cultivables, 79% *Escherichia*, 79% *Salmonella*, 63% *Shigella*, 44% *Enterobacter*, 21% *Cronobacter*, 9% *Providencia*, 11% *Serratia* y 8% *Kluyvera*. Posteriormente se realizó el análisis de asociación de los géneros bacterianos detectados y las variables clínicas de las pacientes, en la cual encontraron solo asociación entre la detección del género *Salmonella* y la presencia de comorbilidades, así como la asociación de la presencia de tumores de mayores a 5 cm con *Serratia*.

Finalmente se concluyó que los métodos moleculares permitieron detectar que el 91% de las muestras presentaban bacterias y una razón importante de no haberse detectado previamente en los cultivos, fue el hecho de que las bacterias no cultivables fueron las que se encontraron con mayor frecuencia. Los resultados proveen elementos para mejorar el tratamiento médico dirigido conjuntamente con el procedimiento quirúrgico para extirpar el tejido dañado.

VII. MARCO TEÓRICO

Una de las formas de identificar la presencia de bacterias en un tejido, donde no fueron identificadas por los métodos tradicionales es por medio de técnicas de biología molecular, haciendo la comparación de las secuencias de los rRNA 16S lo cual permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariontas, que tiene una enorme repercusión en taxonomía bacteriana porque permite la identificación rápida y precisa de las bacterias.

Lo mismo ocurre con los hongos que no fueron identificados mediante las técnicas clínicas convencionales, se recurre a técnicas de biología molecular, en donde se emplea la región ITS (Internal Transcribed Spacer) por sus siglas en inglés. Su detección molecular ofrece distintas ventajas sobre otros objetivos moleculares debido a la existencia un incremento en la sensibilidad por la presencia de cerca de 100 copias por genoma (Figura 1) (Henry, 2000).

En múltiples estudios se ha demostrado la eficiencia de esta región para la identificación de hongos a través de su amplificación por PCR (Henry, 2000; Zhao, *et al.*, 2017).

El DNAr nuclear contiene copias desde 60 hasta 220 que se repiten en tándem, se trata de un sistema complejo en donde se encuentran presentes los genes 18S, 28S y 5.8S. Las secuencias de estos genes se encuentran separadas por dos ITS, de una longitud de entre 200 y 600 pb. Las zonas no codificantes de DNAr (ITS-1, ITS-2) son más susceptibles de acumular mutaciones y por lo tanto tienen gran interés en el estudio de la identificación y tipificación de especies fúngicas (Moris, *et al.*, 2017; Henry, 2000; Zhao, *et al.*, 2017).

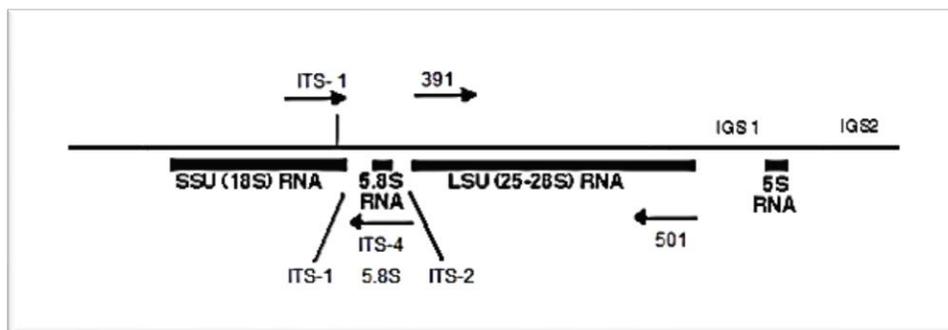


Figura 1. Representación gráfica de la región ITS del material genético de los hongos (Moris, *et al.*, 2017).

Como bien se sabe en la enfermedad granulomatosa crónica existen mutaciones en los genes que codifican para las 5 subunidades que conforman la NADPH oxidasa provocando diferentes efectos dependiendo de las proteínas que se encuentren alteradas, produciendo una afección en el funcionamiento de este sistema, dando paso a procesos de infección de difícil tratamiento, formación de granulomas. De manera similar a lo que ocurre con la MGI, de donde surge la importancia de conocer el funcionamiento del sistema NADPH oxidasa. Este es un complejo conformado por 5 subunidades localizadas tanto en la membrana celular como en el citosol cuya función principal es la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), cuya función es la degradación de microorganismos ajenos al cuerpo (Álvarez, *et al.*, 2009; Vélez, *et al.*, 2016) ^{2, 52}.

1. Proceso de formación del granuloma

La inflamación es la respuesta del sistema inmune a estímulos nocivos, como patógenos, células dañadas, compuestos tóxicos o irradiación, y actúa eliminando los estímulos nocivos e iniciando el proceso de curación. Por lo tanto, la inflamación es un mecanismo de defensa que es vital para la salud. Por lo general durante las respuestas inflamatorias agudas, los eventos e interacciones celulares minimizan eficientemente las lesiones o infecciones inminentes. Este proceso de mitigación contribuye a la restauración de la homeostasis del tejido y la resolución de la inflamación, mediante mecanismos de reacción tisular ante una agresión, que incluye la integración de secuencias moleculares incitadas por el daño tisular causado por la penetración de microorganismos o por la presencia de material extraño exógeno o endógeno; reclutamiento, instrucción y envío de células; eliminación de microorganismos, cuerpos extraños y de células infectadas y/o dañadas; creación de barreras para evitar metástasis y la reparación del tejido lesionado por la agresión o por la respuesta del huésped. Si diferentes causas alteran o bloquean cualquiera de las etapas de este ordenado proceso, la inflamación puede derivar hacia soluciones no deseadas, como la infiltración tisular

por agregados de linfocitos y leucocitos (granulomas) (Chen, *et al.*, 2017; Uysal, 2017).

La inflamación crónica granulomatosa es un patrón característico de la hipersensibilidad tipo IV, que resulta de la persistencia dentro de los macrófagos de patógenos intracelulares u otras sustancias que la célula ni puede procesar o destruir (Vaillant, 2019).

El infiltrado linfocitario perivascular inicial es sustituido por macrófagos en un plazo de 2 a 3 semanas. Los macrófagos acumulados suelen sufrir una transformación morfológica hacia células de aspecto epitelial, por lo que reciben el nombre de células epiteloides. Los macrófagos alterados, en ocasiones alrededor de un foco necrótico central se funden y forman células gigantes multinucleadas. Estas lesiones (granulomas) tan características suelen estar provocadas por agentes infecciosos que se dividen de una forma relativamente lenta o que son de tamaño relativamente grande y en ocasiones por cuerpos extraños. En este proceso se producen citocinas entre ellas las más importantes son TNF- α y TNF- β , IL-2, GM-CSF y IFN- γ (Bahwere, *et al.*, 2017, Galvan-Blasco, *et al.*, 2019).

TNF- α es una potente citocina pleiotrópica con múltiples funciones celulares; actúa de forma autocrina, paracrina y/o sistémica. Se han relacionado de manera crítica anomalías del TNF- α con la patogénesis de diversas enfermedades crónicas inflamatorias (Bahwere, *et al.*, 2017).

IL-2 es una citocina producida por los macrófagos que es esencial para la inducción de la hipersensibilidad retardada. En su encuentro inicial con un microorganismo, los macrófagos en reposo intentan fagocitarlo y eliminarlo, los macrófagos en reposo no están especialmente dotados para ello, pero esta interacción induce la producción de IL-12 que, a su vez, estimula la diferenciación de las células T colaboradoras CD4⁺. La IL-12 es también un potente inductor de la secreción de IFN- γ por las células T y NK (Bahwere, *et al.*, 2017).

IFN- γ es un potente activador de los macrófagos. Los macrófagos activados experimentan varios tipos de cambios: su capacidad para la fagocitosis y destrucción de microorganismos aumenta de forma considerable, expresan mayor cantidad de moléculas de clase II sobre su superficie, facilitando así la presentación

del antígeno, su capacidad para destruir células tumorales se incrementa y secretan varios factores de crecimiento polipeptídicos, como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas y el TGF- β , que estimulan la proliferación de los fibroblastos y la síntesis de colágeno. Así los macrófagos activados actúan eliminando el antígeno agresor y si su activación se mantiene, el resultado final es la fibrosis (Bahwere, *et al.*, 2017).

La IL-2 estimula la proliferación de células T por mecanismos autocrino y paracrino; estas células se acumulan en los lugares donde existen reacciones de hipersensibilidad retardada (Bahwere, *et al.*, 2017).

El TNF- α ejerce efectos importantes en las células endoteliales; 1) aumento de la secreción de prostaciclina que, a su vez favorece el flujo sanguíneo mediante la producción de vasodilatación local; 2) aumento de la expresión de E-selectina que estimula la fijación de los linfocitos y monocitos transeúntes y 3) inducción y secreción de factores quimiotácticos de bajo peso molecular como la IL-8. En conjunto, todos estos cambios del endotelio facilitan la extravasación de linfocitos y monocitos hacia el lugar de la reacción de hipersensibilidad retardada, siendo este tipo de hipersensibilidad un mecanismo importante de defensa frente a diversos patógenos intracelulares, hongos y algunos parásitos (Bahwere, *et al.*, 2017; James, 2000).

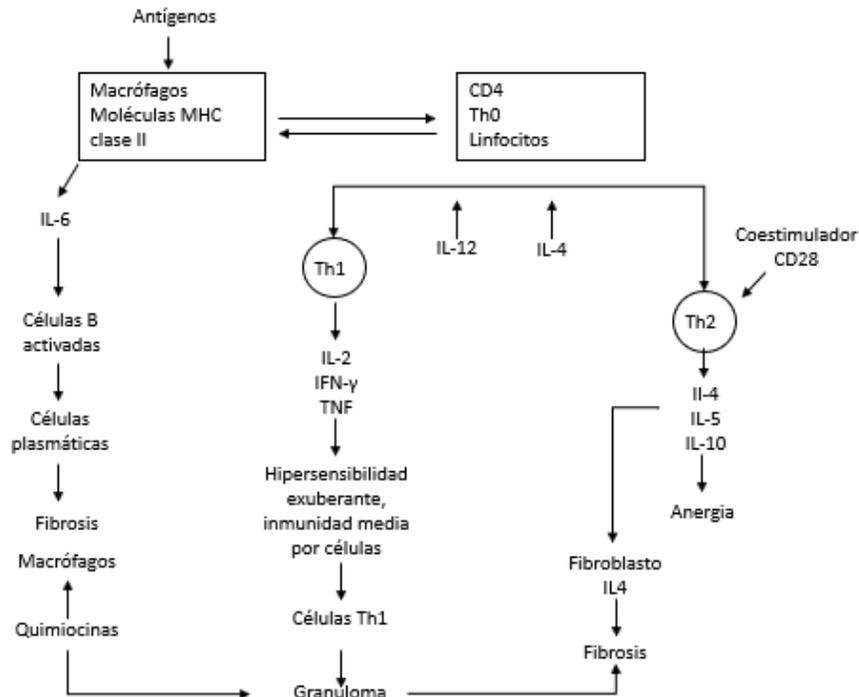


Figura 2. Formación de un granuloma modificado de (James, 2000)

Por lo tanto, se define un granuloma como una colección focal y compacta de células inflamatorias, predominando las células mononucleares; generalmente se forma como resultado de la persistencia de un producto no degradable de hipersensibilidad activa. El granuloma es el resultado final de una de una interacción compleja entre organismo invasor o antígeno, químico, droga y otro irritante, antigenemia prolongada, actividad de macrófagos, una respuesta de células Th1, complejos inmune circulantes, y una gran variedad de mediadores biológicos (Fig. 2). Las áreas de inflamación o reactividad inmunológica atraen a los macrófagos y monocitos que pueden fusionarse para formar células gigantes multinucleadas, y una transformación de macrófagos a células epiteloideas (James, 2000).

Existe una estrecha relación entre macrófagos activados que tienen una mayor expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II y linfocitos Th1 CD4⁺. Estas células T cooperadoras reconocen los péptidos proteicos que les presentan células presentadoras de antígeno que llevan moléculas MHC clase II. La célula T induce la producción IL-1 en el macrófago y posteriormente, una gran cantidad de factores quimiotácticos promueven la granulomagenesis. El interferón gama (IFN-γ) induce un aumento en la expresión

de las moléculas de MHC de clase II en los macrófagos, los receptores activados llevan una fracción Fc de IgG para potenciar su capacidad de fagocitar. El resultado final es el granuloma epiteloide que progresa bajo el impacto del TFG (y las plaquetas) hacia la fibrosis (James,2000).

Las células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos y monocitos) cuentan con un mecanismo que genera radicales libres. A este mecanismo se le denomina estallido respiratorio, que se encarga de la destrucción de agentes patógenos en el cual interviene el sistema NADPH. Este complejo enzimático se localiza en la membrana plasmática, específicos de los fagocitos que cataliza la generación del ion superóxido (O_2^-) a partir de oxígeno molecular con la participación de NADPH oxidasa. Este sistema es de vital importancia en las células fagocíticas porque actúa en la destrucción de microorganismos patógenos mediante las células fagocíticas y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET's), así como la activación de proceso inflamatorios.

Un cambio en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a causa de defectos genéticos en los componentes del sistema generan inmunodeficiencia primaria denominada enfermedad granulomatosa crónica, este tipo de inmunodeficiencia genera mayor susceptibilidad a infección por microorganismos y al desarrollo de granulomas en diferentes órganos (Biesma, *et al.*, 2001).

El complejo enzimático NADPH oxidasa se compone de dos subunidades que abarcan la membrana, gp91 *phagocyte oxidase* (phox) y p22^{phox}, así como los tres componentes citosólicos p47^{phox}, p67^{phox}, y p40^{phox}. Rac1 y Rac2, proteínas de unión a trifosfato de guanosina de peso molecular bajos, también se asocian con el complejo y están involucradas en la regulación de NADPH oxidasa. Éste tiene efecto en los genes que producen NADPH, como son gp91 y gp22, forman un heterodímero llamado flavocitocromo b y p47, p67 y p40 están en la subunidad citosólica; la activación del complejo enzimático consiste en la translocación de los componentes citoplasmáticos a la membrana de las vacuolas fagocíticas o a la membrana plasmática, mediada por estímulos activadores de la proteína quinasa C (PKC) y la participación de proteínas accesorias como Rac2 (ATPasa) y RAP1 (Conti, *et al.*, 2016, Yu, *et al.*, 2016).

2. Fisiopatología de la mastitis granulomatosa idiopática

Existen numerosos estudios que describen los posibles procesos patológicos como explicación para la producción de mastitis granulomatosa idiopática. Sin embargo, uno de los procesos mejor conocidos en la formación de granulomas se presenta cuando existe un mal funcionamiento del sistema NADPH (Conti, *et al.*, 2016). Este mal funcionamiento es generado por mutaciones en los genes que codifican para las proteínas del sistema NADPH oxidasa (gen CYBB) (Goldblatt, 2014)., que a su vez propicia una anomalía en el funcionamiento de los fagocitos para la producción de ROS, lo que conlleva a una incapacidad en la eliminación de microorganismos dentro del fagolisosoma (Miyano, 2007). Caracterizándose estas deficiencias fagocíticas por provocar infecciones bacterianas y fúngicas recurrentes graves (*Candida*, *Aspergillus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia* y *Salmonella typhi*). La respuesta a *Mycobacterias* no tuberculosas también puede ser anormal, desencadenando la producción de abscesos de tejidos y órganos, otras manifestaciones frecuentes incluyen curación anormal de heridas y formación de granulomas (Baslaim, 2007; Belaabidia, 2002).

En el ámbito clínico a los pacientes con esta patología, se debe llevar a cabo la historia clínica de cada paciente, así como el interrogatorio de las manifestaciones clínicas, realizar estudios de apoyo al diagnóstico, establecer un diagnóstico diferencial y proporcionar el tratamiento médico-quirúrgico.

3. Manifestaciones clínicas

La manifestación clínica más común de la MGI es una masa mamaria unilateral palpable sensible de tamaño variable (1-20 cm). En un estudio realizado por Aghajanzadeh 2015, se estimó que los hallazgos de mama bilateral sincrónicos se observaron entre el 1% y hasta en el 18% de los casos, también describieron una masa palpable sensible con eritema y edema cutáneos, e induración cutánea aislada como manifestaciones clínicas menos comunes. Mientras que en otros estudios más pequeños se informaron cambios en la piel de naranja, pesadez o

agrandamiento asimétrico de los senos en aproximadamente 20% de los pacientes. Estos hallazgos también se observan con el cáncer inflamatorio de seno (IBC) (Aghajanzadeh, *et al.*, 2015; Barreto, 2018).

El pezón rara vez se encuentra involucrado; sin embargo, se ha documentado retracción del pezón, ulceración y secreciones. Se han reportado secreciones del pezón en 12% de los casos y las ulceraciones complejas de la areola en el 16% de los casos. La linfadenopatía axilar se detecta ocasionalmente en el examen físico. Este último hallazgo es a menudo más preocupante con respecto a la posible neoplasia mamaria (Barreto, 2018; Fazzio, *et al.*, 2016; Gautier, *et al.*, 2013; Salam, 1995).

La MGI puede manifestarse con la formación de abscesos, con o sin drenaje de los senos para la piel, con una prevalencia variable de 6.6% – 54.0%. Una fístula cutánea puede desarrollarse como una complicación de una biopsia o aspiración percutánea previa. Típicamente estos abscesos se aspiran para realizar análisis microbiológicos. Los datos en la literatura actual indican que la mayoría de los abscesos asociados con la MGI son estériles, sin crecimiento bacteriano en el análisis de cultivo por aspiración, lo que sugiere un proceso inflamatorio no infeccioso (Destek, 2017; Sripathi, 2016). Es importante tener en cuenta que la presencia de un absceso en el examen clínico y/o imagen no debe impedir la biopsia de tejido si el curso clínico sugiere posible malignidad, ya que el IBC también puede manifestarse con colecciones de líquidos (Aghajanzadeh, *et al.*, 2015; Destek, 2017; Fazzio, *et al.*, 2016).

4. Estudios de diagnóstico

Las inflamaciones granulomatosas mamarias son lesiones de difícil diagnóstico y frecuentemente se confunden con afecciones malignas. El diagnóstico de la MGI se realiza por exclusión de otras lesiones granulomatosas y solo puede ser confirmado por estudio histopatológico. El examen histológico de los lobulillos mamarios evidencia una reacción infamatoria granulomatosa, compuesta por histiocitos epiteloideos y células gigantes multinucleadas de tipo Langhans, además de

linfocitos, plasmocitos y ocasionalmente polinucleares. En ocasiones se observa necrosis grasa y acúmulos de polimorfonucleares conformando abscesos que pueden llevar a la fibrosis con distorsión de la arquitectura lobulillar y producir atrofia y degeneración del epitelio, como también dilatación de los conductos mamarios (Freeman, 2017; Medrano-E'Vers, 2017; Pluguez-Turull, 2019; Tafur, 2014).

No existen hallazgos radiológicos específicos para la MGI. La ecografía y mamografía describen la condición como tumoración irregular y mal definida en la mayoría de los pacientes. Por lo que los hallazgos no tienen especificidad para realizar el diagnóstico o excluir el carcinoma mamario (Hovanessian, 2019; Kaviani, *et al.*, 2019; Mediana, 2017).

5. Estudios de apoyo al diagnóstico

5.1 Diagnóstico molecular

En la mayoría de las patologías los microorganismos de interés clínico pueden identificarse a través de cultivos microbiológicos convencionales y pruebas basadas en las características fenotípicas del agente patógeno aislado, existen casos en los que los microorganismos son de difícil crecimiento, identificación, aislamiento o no son cultivables, debido a características propias del microorganismo. Para ello se han desarrollado métodos que permiten detectar la presencia de microorganismos. Debido a la alta sensibilidad de estas técnicas es posible identificar específicamente el microorganismo involucrado. Estas técnicas son la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés *Polimerase Chain Reaction*) y la secuenciación, mediante las cuales se lleva a cabo la amplificación de un fragmento del material genético de interés y la identificación de la especie.

En el caso de los hongos se lleva a cabo la amplificación de la región ITS, que es una región altamente empleada ya que ofrece distintas ventajas sobre otros objetivos moleculares debido a la existencia un incremento en la sensibilidad por la presencia de cerca de 100 copias por genoma (Martín, 2001; Pérez, *et al.*, 2007).

6. Estudios de gabinete

En lo que refiere al abordaje diagnóstico de la MGI se realiza ultrasonido, mastografía, tomosíntesis y en algunos casos es necesario realizar resonancia magnética, esto se debe a que existe un amplio rango de imágenes y pueden presentarse desde cambios sutiles hasta datos compatibles con malignidad.

El Sistema *Breast Imaging and Report Data System* (BI—RADS) se estandarizó como terminología en los reportes de estudios de mastografía y actualmente es obligatorio su uso en todos los informes de mastografía de acuerdo con la NOM 041.SSA2-2011 (Tabla 3) (Pérez, *et al.*, 2007).

Tabla 3. Clasificación de BI-RADS (Pérez, *et al.*, 2007)

Categoría 0	Mastografía: Incompleta. Evaluación de imagen adicional necesaria y/o mastografías anteriores para su comparación Ultrasonido y resonancia magnética: Incompleta. Evaluación de imagen adicional necesaria		
Categoría 1	Negativa		
Categoría 2	Benigna		
Categoría 3	Probablemente benigna		
Categoría 4	Sospechosa	Mastografía y ultrasonido	4A: Baja sospecha de malignidad 4B: Moderada sospecha de malignidad 4C: Alta sospecha de malignidad
Categoría 5	Altamente sugestiva de malignidad		
Categoría 6	Diagnóstico maligno comprobado por biopsia		

Para la valoración de las pacientes con sospecha clínica de mastitis granulomatosa en comparación con la de cáncer inflamatorio, la mastografía requiere de proyecciones adicionales, compresiones focales o magnificaciones, también puede complementarse con otros estudios como ultrasonido o resonancia magnética. En ocasiones es necesario realizarse biopsia guiada con ultrasonido por estereotaxia o marcajes prequirúrgicos. El ultrasonido es la principal herramienta diagnóstica por imagen debido a la presentación clínica de la MGI y permite diferenciar los quistes y los abscesos de los tumores sólidos. Por otro lado, el papel de la resonancia magnética es complementario a la mastografía y el ultrasonido, ya que mejora la detección y caracterización de lesiones mamarias complejas (Cuervo, *et al.*, 2012; Pérez, *et al.*, 2007; Pérez, 2002).

7. Diagnóstico diferencial

De acuerdo a que los hallazgos clínicos y radiológico son a menudo similares a los de un carcinoma, éste sigue siendo el diagnóstico diferencial críticamente importante para la exclusión. Otras entidades patológicas que deben excluirse incluyen angiopaniculitis granulomatosa, sarcoidosis mamaria, mastitis granulomatosas infecciosas, necrosis grasa, ectasia ductal, infecciones por *Mycobacterium tuberculosis*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus spp* y algunas especies de *Candida*, arteritis de células gigantes y poliarteritis nodosa (Pérez, *et al.*, 2007; Pérez, 2002).

8. Tratamiento

No existe consenso sobre el tratamiento ideal para la mastitis granulomatosa idiopática. La ausencia de estudios prospectivos producto de la baja incidencia de esta enfermedad no permite hasta la fecha obtener conclusiones definitivas al respecto; no obstante, a la luz de los conocimientos disponibles actualmente, una opción razonable parece ser la escisión quirúrgica de la lesión seguida de la administración de prednisona a razón de 1 mg/kg/día por cuatro semanas con descenso progresivo hasta su suspensión, asociada a metotrexato 10 mg semanales por vía oral con incremento individualizado de acuerdo con la respuesta clínica obtenida. Esta terapia combinada de esteroides e inmunosupresores tiene por objeto mantener la remisión de la enfermedad y reducir la incidencia de reacciones adversas por la administración prolongada de esteroides (Amir, 2014; Hakamifard, *et al.*, 2017; Soto, 2016).

VIII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La mastitis granulomatosa idiopática es una patología que por sus características clínicas suele confundirse con variadas alteraciones inflamatorias, incluyendo el carcinoma mamario.

La etiología es desconocida, mientras que sus manifestaciones clínicas y el mecanismo de formación de granuloma observadas en el estudio histopatológico muestran una posible afección de los mecanismos fisiopatológicos relacionados con el sistema inmunitario de manera similar a lo que ocurre en la enfermedad granulomatosa crónica en donde está involucrada la afección en la actividad del sistema de NADPH oxidasa que predispone a la incapacidad de generar ROS para la eliminación de microorganismos con la consecuente formación de granulomas, lo cual es compatible con estudios reportados de una asociación con hongos de difícil cultivo, por lo que hacen complicada su detección por métodos convencionales.

No existe consenso sobre el tratamiento ideal para la mastitis granulomatosa idiopática. La ausencia de estudios prospectivos producto de la baja incidencia de esta enfermedad no permite hasta la fecha obtener conclusiones definitivas al respecto, por lo que existe un alto índice de recaídas, deformidades de la mama y afecciones psicológicas.

IX. JUSTIFICACIÓN

La MGI representa un problema grave de salud, debido a que no existe un consenso en cuanto a su abordaje clínico, lo cual provoca que tanto el diagnóstico como el tratamiento de la patología se torne complicado. Esta enfermedad tiende a la cronicidad, causando dolor y deformidades en el seno. El estudio está encaminado a la identificación de hongos, a través del uso de la biología molecular (PCR) para hongos difíciles de identificar mediante técnicas convencionales, esto encaminado a la posibilidad de establecer un tratamiento eficaz a las pacientes para evitar la recidiva, mejorar el pronóstico y la calidad de vida.

X. HIPÓTESIS

El tejido con MGI es infectado con hongos los cuales se pueden detectar mediante técnicas de biología molecular. Esta detección permitirá dirigir la terapia adecuada favoreciendo la curación de la enfermedad y evitando futuras recaídas.

XI. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Identificar hongos en biopsias provenientes de pacientes con Mastitis Granulomatosa Idiopática mediante técnicas de biología molecular y evaluar su asociación con la presentación clínica para mejorar el tratamiento dirigido y reducir el índice de recidivas.

2. Objetivos específicos

- Determinar la presencia de la región ITS de hongos en muestras de biopsia con diagnóstico de mastitis granulomatosa idiopática mediante PCR para realizar la identificación de hongos a través de su secuenciación.
- Evaluar la asociación de los hongos con la presentación clínicas de la patología.

XII. MATERIAL Y MÉTODOS

1. El Esquema general de trabajo se indica en la figura 3

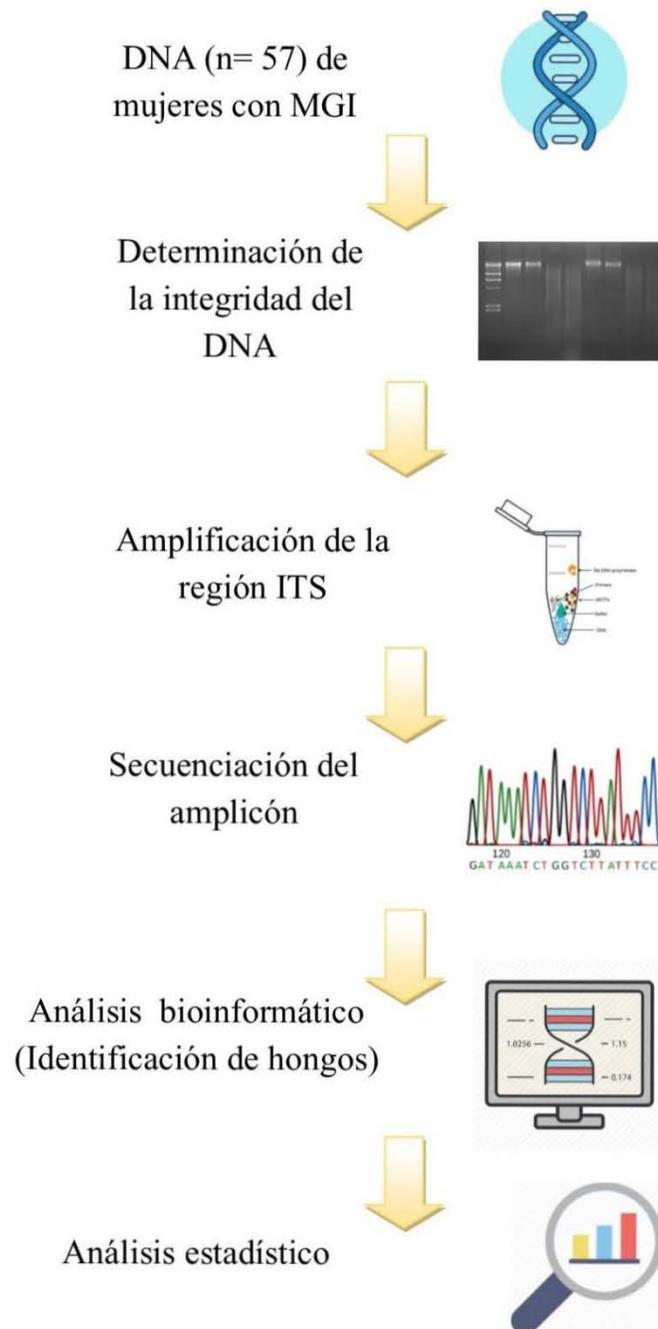


Figura 3. Esquema General de trabajo

2. Diseño

El estudio es de tipo retrospectivo en serie.

3. Población de estudio:

En este estudio se analizaron muestras de tejido mamario obtenido de pacientes militares y derechohabientes con diagnóstico histopatológico de mastitis granulomatosa idiopática en la clínica de tumores mamarios del (HMENMYN)

4. Muestreo:

El tamaño de la muestra fue a conveniencia con base en el número de paciente en abordaje diagnóstico de mastitis granulomatosa idiopática

5. Criterios de selección de la población

5.1 Criterios de Inclusión:

- Todas las pacientes con diagnóstico histopatológico de mastitis granulomatosa que clínicamente fue clasificada como idiopática.

5.2 Criterios de Exclusión:

- Diagnóstico histopatológico de cáncer de mama.
- Diagnóstico histopatológico de mastitis granulomatosa en quienes se identificó una causa (cuerpo extraño, trauma).
- Diagnóstico histopatológico de mastitis aguda o crónica no granulomatosa

5.3 Criterios de Eliminación:

- Tejido insuficiente para su análisis molecular

6. Variables

La tabla siguiente resume las variables exploradas en este estudio

Tabla 4. Variables dependientes e independientes

Variable independiente	Tipo
Diagnóstico de mastitis granulomatosa idiopática confirmado por histopatología	Cualitativa
Variable dependiente	Tipo
Edad	Cualitativa
Estado de procedencia	Cualitativa
Gestaciones previas	Cuantitativa
Enfermedades autoinmunes asociadas	Cualitativa
Comorbilidades asociadas	Cualitativa
Tamaño del tumor	Cuantitativa
Presentación clínica	Cualitativa
Cáncer asociado	Cualitativa
Mama afectada	Cualitativa
Tratamiento	Cualitativa
Anticonceptivos	Cualitativa
BI-RADS	Cualitativa
PCR para detección de la región ITS	Cualitativa

7. Obtención de muestras

La obtención de la muestra se realizó de acuerdo a la revisión de la base de datos del departamento de patología del HMEMYN, en donde se obtuvieron los datos de las pacientes con patologías mamarias en un periodo de tiempo de entre enero del 2012 a julio del 2017. De un total de 89 muestras con diagnóstico histopatológico de mastitis granulomatosa crónica, fueron seleccionadas 68 que se clasificaron como mastitis granulomatosa idiopática. Excluyendo un total de 11 muestras debido a que el material biológico era insuficiente, realizándose la selección de 57 muestras, las cuales fueron utilizadas para la extracción de DNA por (Gutiérrez,

2017) y la evaluación de la integridad mediante electroforesis y la amplificación por PCR de un fragmento del gen de beta globina.

Esta misma muestra fue empleada para amplificación de la región ITS para hongos mediante PCR y su posterior secuenciación.

7.1 Determinación de la integridad de las muestras de DNA

Para conocer las condiciones del material genético empleado en esta experimentación se realizó una corrida electroforética con las muestras de DNA, la cual tuvo una duración de 30 minutos bajo una corriente de 100 V en un gel de agarosa al 1.5 % empleando 2 µl de marcador de peso molecular de 100 pb CSL-MDNA-100BPH DNA Ladder RTU (MARCA). Al término de la corrida el gel se sometió a una tinción con bromuro de etidio al 1% en TBE al 1X y posteriormente fue analizado con el transiluminador-fotodocumentador.

7.2 Amplificación de un control endógeno

La amplificación de un control endógeno se llevó a cabo para detectar diferencias y anomalías en la amplificación de la región de interés, al tratarse de DNA humano se espera siempre la presencia de este gen. En el presente estudio se empleó como control endógeno el gen de la β -globina.

7.3 Amplificación de la región ITS

Se llevó a cabo la amplificación de la región ITS, en hongos debido a que las regiones ITS se encuentran ubicadas entre los genes que codifican para las subunidades 18S y 28S del rRNA y ofrecen distintas ventajas sobre otros objetivos moleculares, además de tener una mayor sensibilidad debido a la existencia de aproximadamente 100 copias por genoma. Asimismo, la variación de secuencia de las regiones ITS ha llevado a su uso en estudios filogenéticos de diversos organismos (Henry, 2000).

Los oligonucleótidos empleados se muestran en la siguiente tabla (Tabla 5).

Tabla 5. Oligonucleótidos específicos para la región ITS de hongos

Oligonucleótido	Secuencia
ITS1F	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS1R	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

La reacción de amplificación se llevó cabo como se describe en la tabla 6.

Tabla 6. Composición de la mezcla de reacción para la PCR de Hongos

Reactivo	Concentración stock	Volumen	Concentración final
Buffer PCR	10X	2.5	1 X
dNTP's	2 mM	2.5	0.2 mM
MgCl ₂	50 mM	2	6 mM
Primer forward	10 µM	2.5	1 µM
Primer reverse	10 µM	2.5	1 µM
Taq polimerasa platinum	5 U/ µl	0.1	0.04 U/ µl
Muestra	-	5	-
Agua libre de nucleasas	-	7.9	-
Volumen total	-	25 µl	-

La PCR se efectuó en un termociclador Axygen® Maxygene II siguiendo la programación como se muestra en la siguiente tabla. (Tabla 7).

Tabla 7. Condiciones de termociclado para la amplificación de la región ITS del DNA

Número de ciclos	Tiempo	Temperatura
1	5 min.	95 °C
30	30 s.	95 °C
	30 s.	62 °C
	30 s.	72 °C
1	5 min.	72 °C

Los amplicones fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 3% (900 mg de agarosa en 30 ml de buffer TBE 1X). En el primer pozo se agregaron 2 µl de marcador de tamaño molecular de 100 pb CSL-MDNA-100BPH DNA Ladder RTU. En cada pozo de gel se agregó una mezcla de 2 µl de buffer de carga y 5 µl del producto de la reacción PCR. La potencia de electroforesis fue de 100 V y se aplicó durante 30 minutos aproximadamente.

El gel se sometió a una tinción con bromuro de etidio al 1% en TBE al 1X y posteriormente fue analizado con el transiluminador-fotodocumentador de geles en búsqueda de la presencia de bandas fluorescentes alineadas con el marcador de

600 pares de bases (pb) ya que los *oligonucleótidos* seleccionados amplifican un fragmento de DNA de aproximadamente 420 a 825 pb debido a la variabilidad que presenta la región ITS (Henry, 2000).

7.4 Secuenciación

Para la obtención de la secuencia e identificación de hongos, el producto de PCR se purificó con el kit de ExoSAP-IT® (ThermoFisher Scientific) cuyos reactivos son una exonucleasa I y la fosfatasa alcalina de camarón (*Pandauls borealis*). La formulación de estos reactivos en buffer lleva a cabo la remoción de oligonucleótidos y la hidrólisis de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's) remanentes al finalizar la reacción de PCR. La exonucleasa degrada los residuos monocatenarios de los oligonucleótidos o de cualquier otro DNA monocatenario, la fosfatasa se encarga de hidrolizar los dNTP's sobrantes de la mezcla de PCR, esto para evitar posibles interferencias en reacciones subsecuentes (Hai-jing, *et al.*, 2016). Con el fin de llevar a cabo dicha reacción fueron colocados en tubos de reacción para PCR los reactivos que se indican en la tabla 8.

Tabla 8. Mezcla de reacción para la purificación de productos obtenidos por PCR

Reactivo	Volumen
ExoSAP-IT	1 µl
Producto de PCR	2.5

Posteriormente se mezclaron y colocaron los tubos de reacción en un termociclador con la programación que se indica en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones de termociclado para la purificación de los productos obtenidos por PCR

Numero de ciclos	Tiempo	Temperatura
1	15 min	37 °C
1	15 min	80 °C
Estabilización		4 °C

El método de secuenciación desarrollado fue el método de Sanger, el cual se fundamenta en un método enzimático, en este caso se emplea el kit BigDye® terminator v.3.1 cycle sequencing (AppliedBiosystems), que contiene dideoxirribunucleotidos (ddNTP's), marcados fluorescentemente, a la cadena de

DNA con espectros de emisión diferentes de la familia diclororodamina (dRodamina) los cuales se incorporan a la hebra creciente de DNA, actuando como terminadores, generando fragmentos de DNA de diferentes longitudes marcados con diferente color en el extremo 3'. La mezcla de reacción se muestra a continuación (Tabla 10).

Tabla 10. Mezcla de reacción para la PCR de secuencia

Reactivo	Volumen
Buffer de secuenciación	2 µl
Mezcla de ddNTP's	1 µl
Oligonucleotido sentido [10 µM]	1 µl
Producto de purificación	2 µl
Agua libre de nucleasas	2 µl
Volumen final	8 µl

Los tubos de reacción se mezclaron perfectamente y fueron sometidos al siguiente tratamiento (Tabla 11).

Tabla 11. Condiciones de termociclado para la PCR de secuencia

Número de ciclos	Tiempo	Temperatura
1	1 min.	96 °C
25	30 s.	96 °C
	15 s.	50 °C
	3 min.	60 °C
1	3 min.	60 °C
Estabilización		4°

Con el fin de realizar una purificación eficiente de los productos de DNA obtenidos se empleó el sistema limpieza con las columnas CENTRI-SEP TM (Lifetechnologies TM), cuyo diseño está basado en el procedimiento de filtración por gel para la purificación del DNA. Previamente se llevó a cabo la hidratación de las columnas agregando 1 ml de agua libre de nucleasas a cada columna, dejándolas en reposo hasta que se encontraron totalmente hidratadas. A continuación, las columnas se centrifugaron (2,800 rpm por 2 minutos) con el fin de eliminar el exceso de agua, en

seguida se realizó la suspensión de los productos de PCR en 10 µl de agua libre de nucleasas, transfiriendo esta última a las columnas, las columnas fueron sometidas a otra centrifugación (2,800 rpm por 2 min) colocándolas sobre un tubo de recolección con el fin de obtener el producto de reacción en estos últimos tubos. Finalmente, una vez seca la cada muestra se añadieron 20 µl de formamida en cada tubo para terminar con la resuspensión del producto.

Para llevar a cabo la secuenciación se recurrió al Laboratorio Divisional de Biología Molecular localizado en la Universidad Autónoma Metropolitana Campus Iztapalapa donde los productos de reacción fueron procesados con el fin de obtener los electroferogramas correspondientes a cada secuencia purificada.

7.5 Análisis bioinformático

Posterior a la secuenciación se analizaron los electroferogramas a través de BIOEDIT. Empleando a su vez la herramienta bioinformática GenBank, en el cual se realizaron alineamientos de las secuencias obtenidas para evaluar la especie de hongo presente en la muestra.

7.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo a través del programa IBM SPSS statistics®. Para evaluar la correlación de la presencia de hongos con la manifestación clínica de la MGI en las muestras.

XIII. RESULTADOS

De un total de 89 biopsias con diagnóstico de mastitis granulomatosa crónica, se seleccionaron 57 con diagnóstico de mastitis granulomatosa idiopática, la exclusión de 32 muestras se debió a que se encontraron asociadas a cuerpo extraño, trauma, infección documentada por cultivo, insuficiencia de muestra u alguna otra causa identificable.

El total de muestras consideradas para el estudio fue de 57. La evaluación de las características de cada muestra a través de su historia clínica permitió integrar las características demográficas y clínicas de las pacientes como se resume en la tabla 12.

Tabla 12. Características demográficas y clínicas de la población

Característica		Frecuencia
Edad (años)		42.5 ± 14.4
Estado de procedencia	Estado de México	12 (21.1 %)
	Ciudad de México	7 (12.3%)
	Veracruz	7 (12.3 %)
	Puebla	4 (7.0 %)
	Guerrero	3 (5.3 %)
	Jalisco	3 (5.3 %)
	Chiapas	3 (5.3 %)
	San Luis Potosí	2 (3.5 %)
	Tlaxcala	2 (3.5 %)
	Morelos	2 (3.5 %)
	Chihuahua	2 (3.5 %)
	Hidalgo	1 (1.8 %)
	Coahuila	1 (1.8 %)
	Guanajuato	1 (1.8 %)
Gestaciones previas		2.4 ± 1.3
	Nuligesta	4 (7 %)
	1 embarazo	8 (14%)
	2 embarazos	19 (33.3%)
	3 embarazos	10 (17.5%)
	4 embarazos	10(17.5%)
	5 embarazos	1(1.8%)
	6 embarazos	1(1.8%)
	Sin datos	4 (7%)
	Si	1 (1.8%)

Enfermedades autoinmunes asociadas	No	52 (91.2%)
	Sin dato	4 (7%)
Comorbilidades asociadas	Ninguna	37 (65%)
	Diabetes	6 (11%)
	Hipertensión	4(7%)
	THE	2 (4%)
	Diabetes Gestacional	2(4%)
	Hipotiroidismo	1(2%)
	Macroadenoma Hipofisario	1(2%)
	Sin dato	4(7%)
	Tamaño del tumor (cm)	
0		5 (8.8%)
1		5 (8.8%)
2		3(5.3%)
3		7 (12.3%)
4		2 (3.5%)
5		11 (19.3%)
6		10 (17.5%)
7		3 (5.3%)
8		2 (3.5%)
10		5 (8.8%)
12		1 (1.8%)
Sin dato		3(5.3)
Presentación clínica		Tumor
	Absceso	21(36.8%)
	Sin lesión	3(5.3%)
Cáncer asociado	Si	15 (26.3%)
	No	42 (73.7%)
Tratamiento	Medico	3 (5.3%)
	Quirúrgico	17 (29.8%)
	Médico-Quirúrgico	37 (64.9%)
Anticonceptivos usados	Ninguno	25 (43.9%)
	Progestina	19 (33.3%)
	Combinados orales	2 (3.5%)
	Combinados parentales	4 (7%)
	No hormonales	3 (5.3%)

1. Determinación de la integridad del DNA

Experimentalmente se efectuó la determinación de la integridad de los DNA extraídos de las biopsias con diagnóstico de mastitis granulomatosa a través de una corrida electroforética en gel de agarosa al 1.5% obteniendo una fotografía. (Fig. 4)

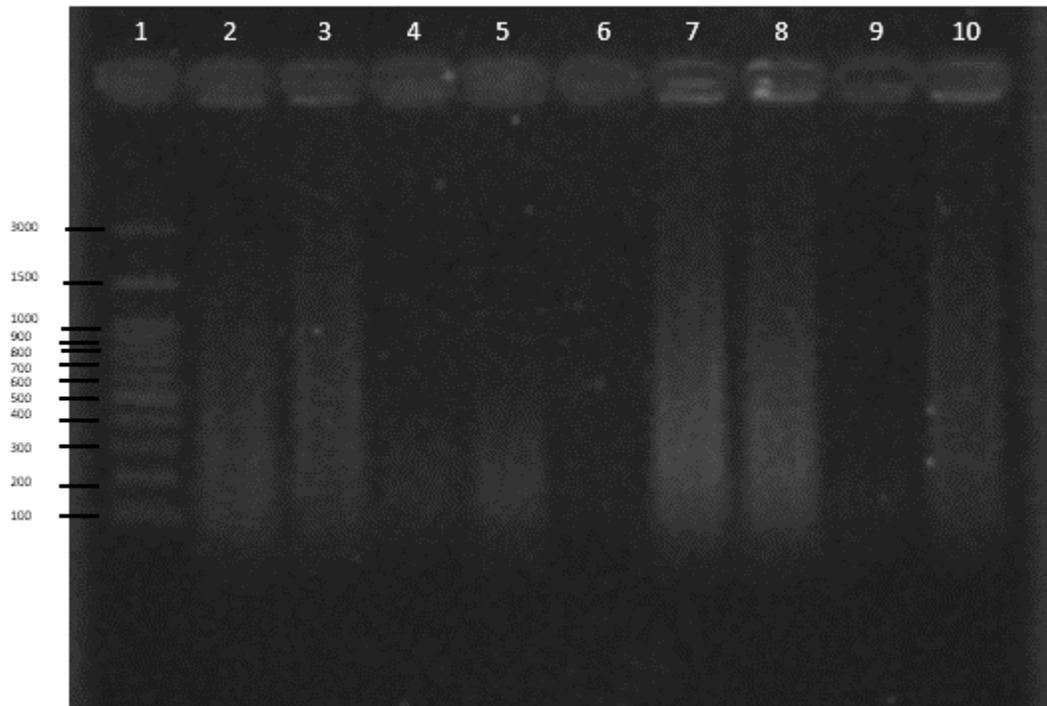


Figura 4. Electroforesis representativa en gel de agarosa al 1.5% con DNA correspondiente a las biopsias con diagnóstico de mastitis granulomatosa idiopática. Carril 1 marcador de tamaño molecular de 100 pb CSL-MDNA-100BPH DNA Ladder RTU. Carriles 2- 10 muestras de DNA

2. Amplificación del control endógeno

En lo que respecta a la amplificación del control endógeno, se realizó la PCR para la β -globina y posteriormente se llevó a cabo una electroforesis en un gel de agarosa al 3%, determinando la presencia de amplicones de aproximadamente 300 pb

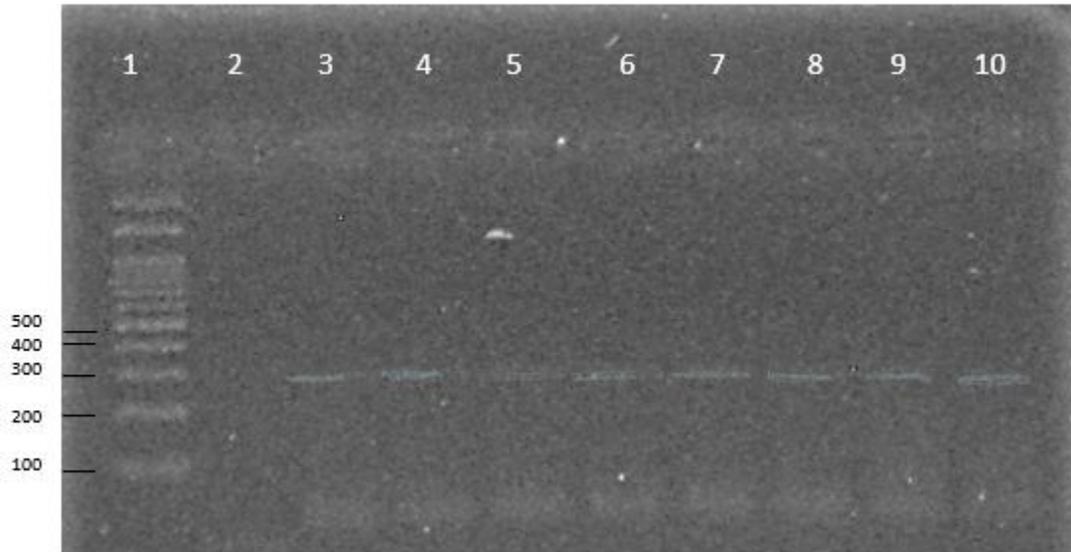


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 3% con productos correspondientes al amplificado de β -globina de la muestra de DNA de la población en estudio. Carril 1 marcador de tamaño molecular de 100 pb pb CSL-MDNA-100BPH DNA Ladder RTU. Carril 2 control negativo. Carril 3-10 productos de amplificación de aproximadamente 300 pb.

3. Amplificación de la región ITS

Una vez realizada la PCR para la amplificación de la región ITS, se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa al 3% se determinó la presencia de productos de reacción específicos para la región ITS del DNA extraído de un tamaño aproximado de 600 pb.

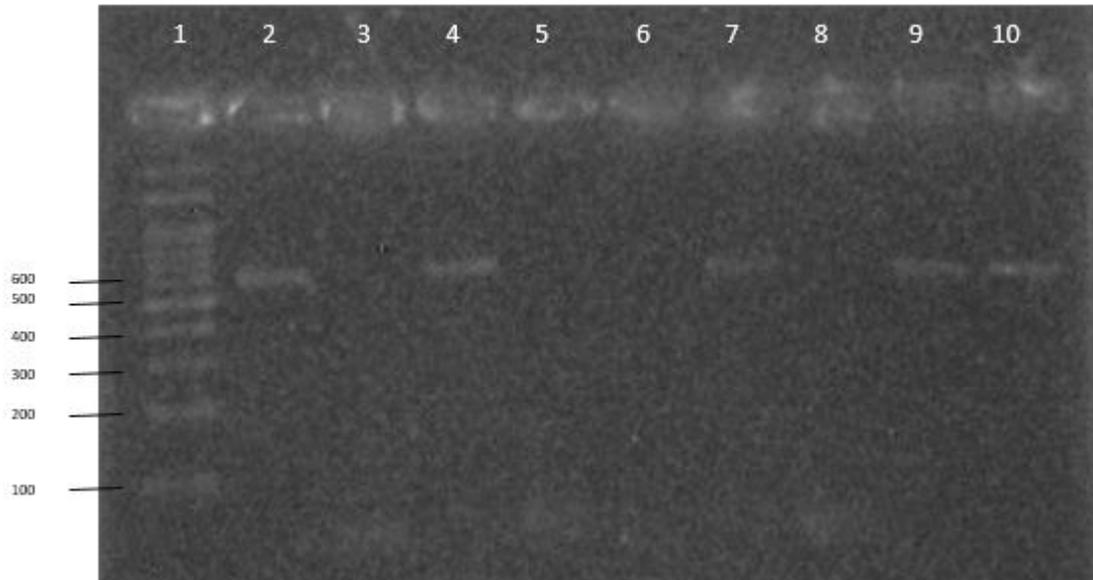


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 3% con productos correspondientes a la región ITS del hongo identificado en la muestra de DNA de la población en estudio. Carril 1 marcador de tamaño molecular de 100 pb CSL-MDNA-100BPH DNA Ladder RTU. Carril 2 control positivo de *Aspergillus fumigatus*. Carril 3 control negativo. Carril 4-10 productos de amplificación de aproximadamente 600 pb

Del total de 57 muestras, se llevó a cabo la amplificación de la región ITS presente en hongos, obteniendo 17 muestras como positivas, indicando que la prevalencia de hongos es del 29%.

Secuenciación de productos correspondientes a la región ITS del DNA fúngico.

4. Secuenciación

Una vez finalizado el protocolo de purificación y secuenciación de los productos de interés se obtuvieron los electroferogramas correspondientes a la región ITS del DNA. En donde fue posible identificar las secuencias de asociación al género y especie fúngico en algunos casos (Fig. 7)



Figura 7. Electroferograma representativo obtenido posterior a la secuenciación empleando la herramienta bioinformática BIOEDIT

5. Análisis bioinformático y estadístico.

Se realizaron los alineamientos de las 17 secuencias resultantes a través de la herramienta bioinformática BIOEDIT y con la herramienta BLAST de NCBI como se representa en la figura 8.

Penicillium chrysogenum strain A3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MF564074.1](#) Length: 544 Number of Matches: 1

Range 1: 10 to 544 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
972 bits(526)	0.0	533/536(99%)	1/536(0%)	Plus/Plus
Query 15	CTCTGAGCTCCACCTCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTGCTTcggcgggcccgcctt	74		
Sbjct 10	CTCTG-GGTCCACCTCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTT	68		
Query 75	aactggcccccgggggcttacgccccggggccgccccgagAACACCCCTCGAACT	134		
Sbjct 69	AACTGGCCGCCGGGGGCTTACGCCCCCGGGCCCGCCCGCGAAGACACCCCTCGAACT	128		
Query 135	CTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAAACCTTCAACAACGGAT	194		
Sbjct 129	CTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAAACCTTCAACAACGGAT	188		
Query 195	CTCTTGGTCCGGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAA	254		
Sbjct 189	CTCTTGGTCCGGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAA	248		
Query 255	ATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCAT	314		
Sbjct 249	ATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCAT	308		
Query 315	GCCTGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGCTCCTCCG	374		
Sbjct 309	GCCTGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGCTCCTCCG	368		
Query 375	ATCCCGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGGGCCACCGGTCCGGTCTCGAGCGTATGG	434		
Sbjct 369	ATCCCGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGGGCCACCGGTCCGGTCTCGAGCGTATGG	428		
Query 435	GGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATC	494		
Sbjct 429	GGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATC	488		
Query 495	CAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCATAACCG	550		
Sbjct 489	CAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCATAACCG	544		

Figura 8. Alineamiento representativo obtenido mediante la plataforma BLAST de NCBI en donde se observa que existe un 99% de identidad entre la secuencia obtenida a través del electroferograma y la secuencia parcial de Penicillium chrysogenum.

Con base en los resultados arrojados por los alineamientos, se lograron identificar a los hongos presentes en las muestras como se resume en la tabla 13 y en la figura 9.

Tabla 13. Hongos identificados en las muestras presentes en las muestras

Hongo identificado	Número de muestras
<i>Mycosphaerella sp</i>	1
<i>Ramularia sp</i>	1
<i>Dothideales sp</i>	1
<i>Dothideomycetes sp</i>	1
<i>Cryptococcus sp</i>	1
<i>Vishniacozyma sp</i>	1
<i>Penicillium sp</i>	13
<i>Periconia byssoides</i>	1
<i>Uncultured fungus</i>	2

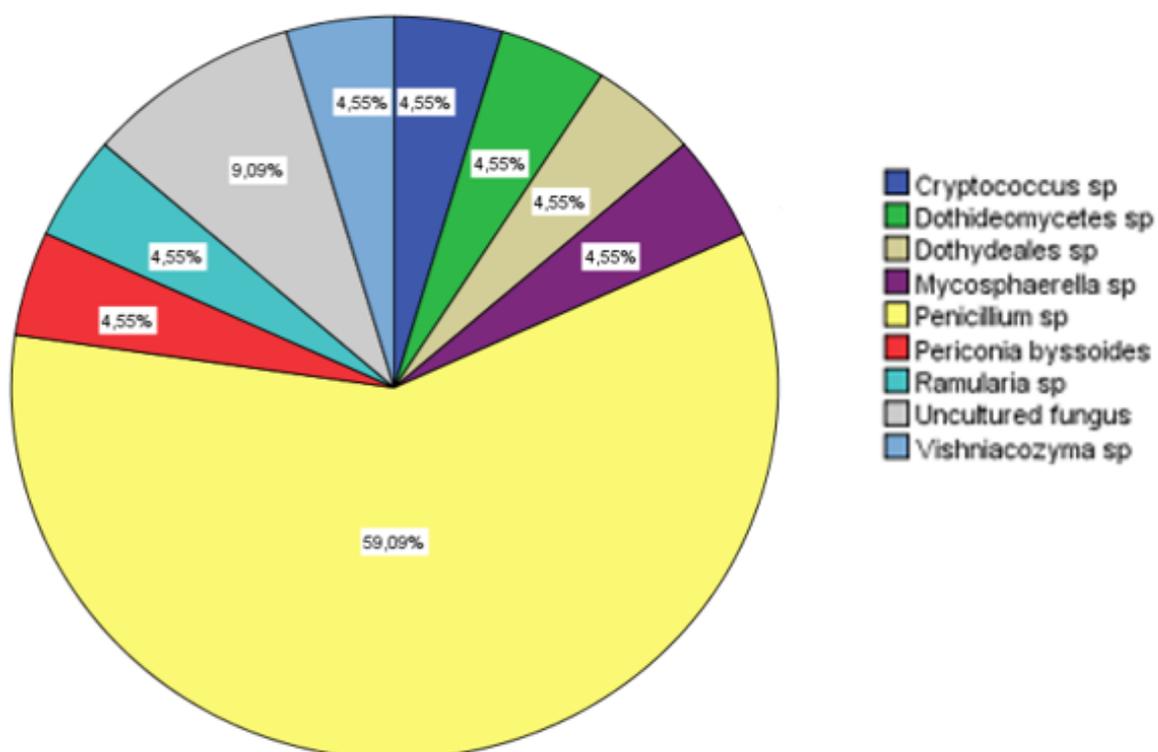


Figura 9. Frecuencia de los géneros fúngicos encontrados en las muestras de estudio

En el estudio realizado por Gutiérrez Bravo (2017), se recopilaban los datos clínicos de las pacientes participantes, mismos que se emplearon en el presente estudio para establecer la posible correlación entre las manifestaciones clínicas y la presencia de hongos en el DNA de la muestra cómo se indica en la tabla 14 (Gutiérrez, 2017).

Tabla 14. Determinación de la significancia estadística de la relación entre el hongo presente y la manifestación clínica

Manifestación clínica	Hongo								
	<i>Mycosphaerella</i> sp.	<i>Ramularia</i> sp.	<i>Cryptococcus</i> sp.	<i>Vishniacozyma</i> sp.	<i>Dothideales</i> sp.	<i>Dothideomycetes</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Periconia byssoides</i>	<i>Uncultured fungus</i>
	OR (CI)	OR (CI)	OR (CI)	OR (CI)	OR (CI)	OR (CI)	OR (CI)	OR (CI)	OR (CI)
Tamaño	0.377 (0.267-0.533)	0.377 (0.267-0.533)	*	*	0.604 (0.485-0.751)	0.604 (0.485-0.751)	1.061 (0.622-1.810)	0.604 (0.485-0.751)	0.604 (0.485-0.751)
Gestas	0.404 (0.29-0.563)	0.404 (0.290-0.562)	0.404 (0.290-0.562)	0.404 (0.290-0.562)	0.577 (0.457-0.728)	0.577 (0.457-0.728)	1.220 (0.658-2.259)	0.577 (0.457-0.728)	0.577 (0.457-0.728)
Nódulos palpables	0.231 (0.140-0.379)	0.231 (0.140-0.379)	0.750 (0.641-0.877)	0.750 (0.641-0.877)	0.231 (0.140-0.379)	0.231 (0.140-0.379)	1.171 (0.760-1.803)	0.750 (0.641-0.877)	0.750 (0.641-0.877)
Mama afectada	0.455 (0.340-0.607)	0.455 (0.340-0.607)	0.527 (0.411-0.677)	0.527 (0.411-0.677)	0.527 (0.411-0.677)	0.527 (0.411-0.677)	2.0 (0.525-7.621)	0.455 (0.340-0.607)	0.455 (0.340-0.607)
Asociado a cáncer	0.732 (0.625-0.858)	0.732 (0.625-0.855)	0.250 (0.159-0.394)	0.250 (0.159-0.394)	0.732 (0.625-0.855)	0.732 (0.625-0.855)	0.492 (0.095-2.562)	0.250 (0.159-0.394)	0.250 (0.159-0.394)
Tratamiento	0.698 (0.585-0.833)	0.698 (0.585-0.833)	0.698 (0.585-0.833)	0.698 (0.585-0.833)	0.283 (0.184-0.434)	0.283 (0.184-0.434)	1.345 (0.312-5.798)	0.283 (0.184-0.434)	0.283 (0.184-0.434)
Nódulos visibles	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Comorbilidades	0.288 (0.188-0.442)	0.288 (0.188-0.442)	0.692 (0.578-0.830)	0.692 (0.578-0.830)	0.692 (0.578-0.830)	0.692 (0.578-0.830)	1.061 (0.679-1.657)	0.692 (0.578-0.830)	0.692 (0.578-0.830)

* Ausencia de datos para realizar la comparación

Con base en el análisis de asociación (Tabla 14) de los géneros fúngicos detectados y las variables clínicas de los pacientes, no se evidenciaron asociaciones.

XIV. DISCUSIÓN

La mastitis granulomatosa idiopática es una patología benigna del seno poco frecuente. Es una rara condición inflamatoria crónica que ocurre alrededor de los lóbulos o ductos, en ausencia de infección específica, trauma o material extraño. Afecta generalmente mujeres en edad reproductiva. La fisiopatología de MGI aún no está descrita, el inicio de la patología se ha asociado a reacciones con el uso de anticonceptivos, procesos infecciosos y procesos autoinmunes. Aunque se considere una condición benigna, puede presentarse con manifestaciones locales que simulan carcinoma (Bani-Hani, 2004; Kessler & Wolloch, 1972.).

Kessler y Wolloch sugieren un origen autoinmune dada las similitudes con la tiroiditis y la orquitis granulomatosa, lo cual es sustentado en la buena respuesta a la terapia con esteroides, sin embargo, no existen evidencias de anormalidades del sistema autoinmune. También se ha sugerido una respuesta inmune local a la extravasación de secreciones lácticas desde los lobulillos, provocando una reacción a cuerpo extraño, o bien una causa hormonal (Kessler & Wolloch, 1972, Pérez, 2002).

Se asocia frecuentemente a posparto y la lactancia. La lesión se presenta desde algunos meses hasta ocho años posteriores a la última gestación (Kessler & Wolloch, 1972, Pérez, 2002; Vaillant, 2019).

Esta condición se presenta con mamas asimétricas por tumoración única o múltiple, dolorosa, firme, mal definida y unilateral o bilateral en cualquier cuadrante de la mama, en ausencia de signos sistémicos de infección. Como consecuencia de la inflamación granulomatosa, se puede presentar engrosamiento cutáneo, fistular, ulceraciones, abscesos, deformidades, linfadenopatía axilar y retracción o inversión de pezón, lo que puede confundirse clínicamente con un carcinoma mamario (Reyna-Villasmil, 2018).

El diagnóstico debe hacerse por la evidencia histológica en una muestra de tejido extraído quirúrgicamente, con evidencia de granuloma y ausencia de infección. Se puede observar inflamación crónica mixta compuesta por linfocitos, células plasmáticas, histiocitos epitelioides, macrófagos espumosos, células gigantes epitelioides multinucleadas e infiltración de neutrófilos (Pluguez-Turull, 2019; Salam, 1995).

Previo al diagnóstico de MGI, se deben excluir otras causas conocidas de la inflamación granulomatosa de la mama, entre ellas se encuentra la sarcoidosis, ectasia del conducto, granulomatosis de Wegener, arteritis de células gigantes, tuberculosis, infección por *Corynebacterium*, infección micótica, reacción granulomatosa secundaria a la presencia de carcinoma y reacción de cuerpo extraño (Fazzio, 2016). Las muestras de cultivo y tinción especial, incluidos Ziehl-Neelsen, PAS, argéntica y plateado de Warthin-Starry, pueden descartar lesiones granulomatosas infecciosas de mama poco frecuentes (Fleming, 2018; Henry, 2000).

Aunque en la actualidad existen numerosas técnicas de identificación de microorganismos, existe la limitante de que ciertas bacterias y hongos son de difícil crecimiento por lo que no es posible identificarlos mediante técnicas convencionales, para ello es indispensable el uso de técnicas con mayor sensibilidad como lo son las técnicas de biología molecular (PCR, secuenciación). De acuerdo con lo establecido anteriormente surge la necesidad de identificar hongos en las muestras de DNA con diagnóstico de MGI obtenidas previamente por Gutiérrez Bravo (2017) para ello se evaluó la integridad del DNA con el propósito de conocer las condiciones en las cuales se encuentra la muestra a trabajar (Gutiérrez, 2017). De acuerdo con lo observado en la figura 4, logramos identificar que existe barrido en las muestras, lo cual significa que presentan un alto grado de degradación, esto debido a que la muestra tiene dos años de haber sido extraída, aunado con la manipulación que ha recibido representa un factor esencial para el mantenimiento e integridad de la muestra.

Posteriormente se llevó a cabo la amplificación de la región ITS (Figura.6) en donde podemos observar que el fragmento amplificado oscila alrededor de los 600 pb, que corresponde a lo reportado en la literatura sobre el tamaño aproximado de la región ITS (Henry, 2000, Orozco-Urbe, *et al.*, 2008). Se identificaron un total de 17 muestras con resultado positivo para la presencia de los siguientes hongos: *Mycosphaerella sp*, *Ramularia sp*, *Dothideales sp*, *Dothideomycetes sp*, *Cryptococcus sp*, *Vishniacozyma sp*, *Penicillium sp*, *Periconia byssoides*,

Uncultured fungus. Como se muestra en la tabla 13 en la cual se puede observar que existe un predominio de la presencia de *Penicillium sp.*

De acuerdo con los hongos identificados en cada muestra se realizó la evaluación de la existencia de correlaciones con la manifestación clínica de la MGI (Tabla 14), en donde se puede observar que no existe correlación entre los hongos con la muestra, esto se puede verificar con la evaluación de los Odds ratio de cada muestra en donde se encontraban por debajo de un valor de 1. De acuerdo con lo reportado en la literatura un Odds Ratio (OR) es una medida de efecto comúnmente utilizada para comunicar los resultados de una investigación en salud. Matemáticamente un OR corresponde a un cociente entre dos odds, siendo un odds una forma alternativa de expresar la posibilidad de ocurrencia de un evento de interés o de presencia de una exposición (Cerdeña, 2013). En este sentido se considera que un valor superior a 1 de OR supone una probabilidad de presentar correlación. Tomando en consideración lo anterior el único hongo identificado que puede suponer correlación es *Penicillium sp.* con el tamaño, el cual presenta un valor de OR=1.061 (Intervalo de confianza = 0.622-1.810, p=0.823), con el número de gestas OR=1.220 (Intervalo de confianza 0.658-2.259, p=0.5), nódulos palpables OR=1.171 (Intervalos de confianza 0.760-1.803, p=0.424), mama afectada OR=2.0 (Intervalo de confianza 0.525-7.621 p=0.310), tratamiento OR=1.345 (Intervalo de confianza 0.312-5.798, p=0.823) y comorbilidades OR=1.061 (Intervalo de confianza 0.679-1.657, p=0.787). Considerando que el valor de Odds ratio es mayor a 1 se podría considerar que representa un factor de riesgo, pero dado el valor de P que presenta se rechaza debido a que se trata de significación asintótica, que es el nivel de significación basado en la distribución asintótica del estadístico de contraste. Normalmente un valor menor que 0,05 se considera significativo. La significación asintótica se basa en la asunción de que el conjunto de datos es grande. Si el conjunto de datos es pequeño o se distribuye de manera pobre, puede que no sea un buen indicador de la significación (Cerdeña, 2013). En este caso como todos los factores de p son mayores a 0.05, son valores no significativos y por lo tanto se rechaza la existencia de correlación.

Una vez aclarado lo anterior, aún queda dilucidar el porqué de la incidencia mayor de *Penicillium sp.* esto puede justificarse por la presencia de falsos positivos relacionados con algunas penicilinas semi-sintéticas (penicilina- tazobactam, cefalosporinas, etc) debido a que existe la probabilidad de generar reacciones cruzadas con restos de *Penicillium spp.* presentes en las muestras y dada la sensibilidad de la PCR se detectaron en dichas muestras (Figueras-Nadal, *et al.*, 2016).

Finalmente, la evaluación de la identificación molecular de hongos en las muestras de MGI se llevó a cabo debido a la presencia de hongos en las muestras, los cuales no fueron identificados mediante técnicas convencionales, ya que son hongos de difícil cultivo o que su determinación no es muy común en la patología.

La presencia de hongos en 17 muestras nos aproxima a que, debido a la sensibilidad de las técnicas de biología molecular, se pueden realizar diagnósticos más certeros que a su vez nos encaminan de manera clara al establecimiento de un tratamiento más efectivo.

XV. CONCLUSIONES

En el presente estudio se demostró que las muestras en las que no fue posible identificar un agente microbiológico mediante técnicas convencionales, se puede evidenciar la presencia de estos con ayuda de técnicas con mayor sensibilidad como lo son las técnicas moleculares. Esto fue posible dado que en 17 del total de muestras se encontraron muestras de hongos los cuales no habían sido identificados clínicamente. La mayoría de las muestras exploradas corresponden a *Penicillium sp.* con un 59.09%, mientras que los hongos incultivables representan un 9.09%. Esto nos indica que existe un predominio del género *Penicillium* debido posiblemente a una reacción cruzada con penicilinas semisintéticas.

XVI. PERSPECTIVAS

En el presente estudio fue posible la identificación de hongos en muestras de tejido de las pacientes diagnosticadas con MGI mediante técnicas de biología molecular.

Lo que nos orienta a:

- La posibilidad que en estas pacientes exista alguna mutación parcial en los componentes del sistema NADPH provocando a su vez que el organismo sea incapaz de eliminar microorganismos patógenos. Por esta razón habría que identificar si la presencia de estas mutaciones explica la formación del granuloma en las pacientes con MGI.

XVII. REFERENCIAS

- Aghajanzadeh, M., Hassanzadeh, R., Alizadeh Sefat, S., Alavi, A., Hemmati, H., & Esmaeili Delshad, M. et al. (2015). Granulomatous mastitis: Presentations, diagnosis, treatment and outcome in 206 patients from the north of Iran. *The Breast*, 24(4), 456-460. doi:10.1016/j.breast.2015.04.003
- Álvarez Cardona, A., Yamazaki Nakashimada, M., & Espinosa Padilla, S. (2009). Enfermedad granulomatosa crónica. *Revista Alergia México*, 56(5), 165-74.
- Amir, L. (2014). ABM Clinical Protocol #4: Mastitis, Revised March 2014. *Breastfeeding Medicine*, 9(5), 239-243. doi:10.1089/bfm.2014.9984
- Bahwere, P., James, P., Abdissa, A., Getu, Y., Getnet, Y., Sadler, K., & Girma, T. (2017). Use of tuberculin skin test for assessment of immune recovery among previously malnourished children in Ethiopia. *BMC Research Notes*, 10(1). doi:10.1186/s13104-017-2909-x
- Bani-Hani, K., Yaghan, R., Matalaka, I., & Shatnawi, N. (2004). Idiopathic Granulomatous Mastitis: Time to Avoid Unnecessary Mastectomies. *The Breast Journal*, 10(4), 318-322. doi:10.1111/j.1075-122x.2004.21336.x
- Barrero P., R., Benavides M., A., León B., M., Barrero V., D., & Vargas V., V. (2005). Mastitis granulomatosa idiopática y mastitis de células plasmáticas: experiencia de tres años. *Revista Chilena De Obstetricia Y Ginecología*, 70(5). doi:10.4067/s0717-75262005000500008
- Barreto, D., Sedgwick, E., Nagi, C., & Benveniste, A. (2018). Granulomatous mastitis: etiology, imaging, pathology, treatment, and clinical findings. *Breast Cancer Research And Treatment*, 171(3), 527-534. doi:10.1007/s10549-018-4870-3
- Baslaim, M., Khayat, H., & Al-Amoudi, S. (2007). Idiopathic Granulomatous Mastitis: A Heterogeneous Disease with Variable Clinical Presentation. *World Journal Of Surgery*, 31(8), 1677-1681. doi:10.1007/s00268-007-9116-1
- Belaabidia, B., Essadki, O., El Mansouri, A., & Sqalli, S. (2002). Mastite granulomateuse idiopathique : à propos de huit cas avec revue de la

littérature. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 30(5), 383-389.
doi:10.1016/s1297-9589(02)00337-5

- Biesma, D., Hannema, A., van Velzen-Blad, H., Mulder, L., van Zwieten, R., Kluij, I., & Roos, D. (2001). A family with complement factor D deficiency. *Journal Of Clinical Investigation*, 108(2), 233-240. doi:10.1172/jci12023
- Cerda, J., Vera, C., & Rada, G. (2013). Odds ratio: aspectos teóricos y prácticos. *Revista Médica De Chile*, 141(10), 1329-1335. doi:10.4067/s0034-98872013001000014
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., & Deng, J. et al. (2017). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6). doi:10.18632/oncotarget.23208
- Conti, F., Lugo-Reyes, S., Blancas Galicia, L., He, J., Aksu, G., & Borges de Oliveira, E. et al. (2016). Mycobacterial disease in patients with chronic granulomatous disease: A retrospective analysis of 71 cases. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, 138(1), 241-248.e3. doi:10.1016/j.jaci.2015.11.041
- Cuervo, S., Bonilla, D., Murcia, M., Hernández, J., & Gómez, J. (2012). Mastitis tuberculosa. *Biomedica*, 33(1). doi:10.7705/biomedica.v33i1.1426
- Destek, S., Gul, V., Ahioglu, S., & Serin, K. (2017). Pituitary Adenoma and Hyperprolactinemia Accompanied by Idiopathic Granulomatous Mastitis. *Case Reports In Endocrinology*, 2017, 1-4. doi:10.1155/2017/3974291
- Fazzio, R., Shah, S., Sandhu, N., & Glazebrook, K. (2016). Idiopathic granulomatous mastitis: imaging update and review. *Insights Into Imaging*, 7(4), 531-539. doi:10.1007/s13244-016-0499-0
- Figueras-Nadal, C., Díaz de Heredia-Rubio, C., Navarro-Gómez, M., Roselló-Mayans, E., & Álvarez-González, F. Infección fúngica invasiva (IFI): actualización. *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de la AEP: Infectología pediátrica*, 135-147.
- Fleming, D., Stone, J., & Tansley, P. (2018). Spontaneous Regression and Resolution of Breast Implant-Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma:

- Implications for Research, Diagnosis and Clinical Management. *Aesthetic Plastic Surgery*, 42(3), 672-678. doi:10.1007/s00266-017-1064-z
- Freeman, C., Xia, B., Wilson, G., Lewis, J., Khan, S., & Lee, S. et al. (2017). Idiopathic granulomatous mastitis: A diagnostic and therapeutic challenge. *The American Journal Of Surgery*, 214(4), 701-706. doi:10.1016/j.amjsurg.2017.07.002
 - Galvan-Blasco, P., Guilarte, M., Cardona, V., Labrador-Horrillo, M., Sala-Cunill, A., Gil-Serrano, I., & Luengo, O. (2019). Delayed drug hypersensitivity to bortezomib: Desensitization and tolerance to its analogue carfilzomib. *Allergy*. doi:10.1111/all.13735
 - Gautier, N., Lalonde, L., Tran-Thanh, D., Khoury, M., David, J., & Labelle, M. et al. (2013). Chronic granulomatous mastitis: Imaging, pathology and management. *European Journal Of Radiology*, 82(4), e165-e175. doi:10.1016/j.ejrad.2012.11.010
 - Goldblatt, D. (2014). Recent advances in chronic granulomatous disease. *Journal Of Infection*, 69, S32-S35. doi:10.1016/j.jinf.2014.07.013
 - Gutierrez, Bravo, M. (2017) *Identificación molecular de bacterias basado en el 16 S ribosomal en casos de mastitis granulomatosa idiopática y resultados en su abordaje clínico* (Tesis de maestría). Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional
 - Hakamifard, A., Salehi, M., Salehi, M., Kalbasi, N., Salehi, H., Salehi, M., & Sharifian, J. (2017). Corticosteroid and Azithromycin in Idiopathic Granulomatous Mastitis. *Advanced Biomedical Research*, 6(1), 8. doi:10.4103/2277-9175.199259
 - Hai-jing Yu, Hua Deng, Jian Ma, Shu-jun Huang, Jian-min Yang. (2016) Clinical metagenomics analysis of bacterial communities in breast abscesses of granulomatous mastitis. *International Journal of Infectious Diseases*, 53; 30-33.
 - Henry, T., Iwen, P., & Hinrichs, S. (2000). Identification of Aspergillus Species Using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. *Journal Of Clinical Microbiology*, 38(4), 1510-1515.

- Hovanessian Larsen LJ, e. (2019). Granulomatous Lobular Mastitis: Imaging, Diagnosis, and Treatment : *American Journal of Roentgenology*, 193(2), 574-581. doi: 10.2214/AJR.08.1528
- James, D. (2000). A clinicopathological classification of granulomatous disorders. *Postgraduate Medical Journal*, 76(898), 457-465. doi:10.1136/pmj.76.898.457
- Johnstone, K., Robson, J., Cherian, S., Wan Sai Cheong, J., Kerr, K., & Bligh, J. (2017). Cystic neutrophilic granulomatous mastitis associated with *Corynebacterium* including *Corynebacterium kroppenstedtii*. *Pathology*, 49(4), 405-412. doi:10.1016/j.pathol.2017.01.006
- Kaviani, A., Vasigh, M., Omranipour, R., Mahmoudzadeh, H., Elahi, A., Farivar, L., & Zand, S. (2019). Idiopathic granulomatous mastitis: Looking for the most effective therapy with the least side effects according to the severity of the disease in 374 patients in Iran. *The Breast Journal*, 25(4), 672-677. doi:10.1111/tbj.13300
- Kessler, E., & Wolloch, Y. (1972). Granulomatous Mastitis: A Lesion Clinically Simulating Carcinoma. *American Journal Of Clinical Pathology*, 58(6), 642-646. doi:10.1093/ajcp/58.6.642
- Martín, M., & Álvaro, I. (2001). Notas preliminares sobre las técnicas de amplificación y variación de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) en el género *Encalypta* (Encalyptaceae, Bryophyta). *Botanica Complutensis*, 25, 233-233.
- Medina Pérez, V., Navarro Otero, M., & Rodríguez Gómez, M. (2015). Mastitis granulomatosa idiopática, simuladora del cáncer de mama. *Medicentro Electrónica*, 19(4), 258-261.
- Medrano-E'Vers, A., Morales-Hernández, A., Valencia-López, R., & Hernández-Salcedo, D. (2017). Enfermedad granulomatosa crónica. *Medicina Interna De México*, 33(3), 407-414.
- Miyano, K., & Sumimoto, H. (2007). Role of the small GTPase Rac in p22phox-dependent NADPH oxidases. *Biochimie*, 89(9), 1133-1144. doi:10.1016/j.biochi.2007.05.003

- Moris, D., Damaskos, C., Davakis, S., Vailas, M., Garmpis, N., & Spartalis, E. et al. (2017). Is idiopathic granulomatous mastitis a surgical disease? The jury is still out. *Annals Of Translational Medicine*, 5(15), 309-309. doi:10.21037/atm.2017.05.24
- Orozco-Uribe, M., Hueso-Guerrero, E., Fallad-Chávez, T., Vargas-Amado, G., & Villalobos-Arámbula, A. (2008). Obtención de secuencias de DNAr ITS y LSU para la identificación de un aislado de nematodo entomopatógeno nativo (*Rhabditida steinernematidae*). *Avances en la Investigación Científica en el Cúba*. 155-160
- Pérez P, J., Bohle O, J., Sánchez C, G., Carrasco L, C., & Mariángel P, P. (2007). Mastitis granulomatosa idiopática: Diagnóstico y tratamiento en 14 casos. *Revista Chilena De Cirugía*, 59(4). doi:10.4067/s0718-40262007000400003
- Pérez P, J., Carpio P, D., & Gac E, P., (2002). Mastitis granulomatosa idiopática. *Revista Chilena de Cirugía*. 54(4), 392-395.
- Pérez-Badillo, M., Villaseñor-Navarro, Y., Pérez-Zúñiga, I., Pavón-Hernández, C., Cruz-Morales, R., & Aguilar-Cortázar, L. (2012). Mastitis granulomatosa idiopática, la gran imitadora del cáncer de mama. *Gaceta Mexicana De Oncología*, 11(4), 238-245.
- Pluguez-Turull CW, e. (2019). Idiopathic Granulomatous Mastitis: Manifestations at Multimodality Imaging and Pitfalls. *Radiographics*, 38(2), 330-356. doi: 10.1148/rg.2018170095
- Reyna-Villasmil, E., Rondón-Tapia, M., & Torres-Cepeda, D. (2018). Mastitis granulomatosa idiopática. Reporte de caso. *Revista Peruana De Ginecología Y Obstetricia*, 64(4), 671-675. doi:10.31403/rpgo.v64i2138
- Salam, M., Alhomsy, M., Daniel, M., & Sim, A. (1995). Diagnosis and treatment of granulomatous mastitis. *British Journal Of Surgery*, 82(2), 214-214. doi:10.1002/bjs.1800820227
- Soto Granados, M & Maldonado Palacios, B., (2016) Mastitis granulomatosa idiopática. Presentación de un caso y revisión de la literatura. *Cirujano General*, 38 (4), 199-202

- Sripathi, S., Ayachit, A., Bala, A., Kadavigere, R., & Kumar, S. (2016). Idiopathic granulomatous mastitis: a diagnostic dilemma for the breast radiologist. *Insights Into Imaging*, 7(4), 523-529. doi:10.1007/s13244-016-0497-2
- Tafur, K., Cáceres, J., & Accinelli, R. (2014). Características clínicas y anatómo-patológicas de las pacientes que ingresaron al Programa de Control de Tuberculosis con diagnóstico de tuberculosis de mama: Clinical and pathological features of patients treated at the tuberculosis control program with the diagnosis of breast tuberculosis. *Revista Medica Herediana*, 25(4), 215-222.
- Uysal, E., Soran, A., & Sezgin, E. (2017). Factors related to recurrence of idiopathic granulomatous mastitis: what do we learn from a multicentre study?. *ANZ Journal Of Surgery*, 88(6), 635-639. doi:10.1111/ans.14115
- Vaillant, A., Zulfiqar, H., Ramphul, K. (2019) Delayed Hipersensitivity reactions. In Statpearls [Internet] https://ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519023/#_NBK519023_pubdet_
- Vargas Hernández, V, M., (2014). Mastitis granulomatosa idiopática. *Revista Hospital Juárez de México*, 81(3), 174-181.
- Vélez Tobón, G., Rocha Arrieta, Y., Arias Sierra, A., & López Quintero, J. (2016). Función del sistema NADPH oxidasa en la formación de trampas extracelulares de los neutrófilos (NETs). *Revista Cubana De Hematología, Inmunología Y Hemoterapia*, 32(1), 43-56.
- Wang, Y., Li, Q., Zhou, L., Guan, R., Zhou, X., & Wu, J. et al. (2017). Granulomatous Lobular Mastitis Associated with Mycobacterium abscessus in South China: A Case Report and Review of the Literature. *Case Reports In Infectious Diseases*, 2017, 1-4. doi:10.1155/2017/7052908
- Yaghan, R., Hamouri, S., Ayoub, N., Yaghan, L., & Mazahreh, T. (2019). A Proposal of a Clinically Based Classification for Idiopathic Granulomatous Mastitis. *Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention*, (20), 929-934. doi: 10.31557/APJCP.2019.20.3.929
- Yu, H., Deng, H., Ma, J., Huang, S., Yang, J., & Huang, Y. et al. (2016). Clinical metagenomic analysis of bacterial communities in breast abscesses of

granulomatous mastitis. *International Journal Of Infectious Diseases*, 53, 30-33.
doi:10.1016/j.ijid.2016.10.015

- Zhao, Y., Bassiouni, A., Tanjararak, K., Vreugde, S., Wormald, P., & Psaltis, A. (2017). Role of fungi in chronic rhinosinusitis through ITS sequencing. *The Laryngoscope*, 128(1), 16-22. doi:10.1002/lary.26702