

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA



TESIS

**FRECUENCIA DE NEOPLASIAS EN PERROS EN EL ÁREA
METROPOLITANA DE MONTERREY, N.L. Y COCCIDIOIDOMICOSIS
EN ALGUNOS CASOS CON SOSPECHA ORIGINAL DE NEOPLASIA.**

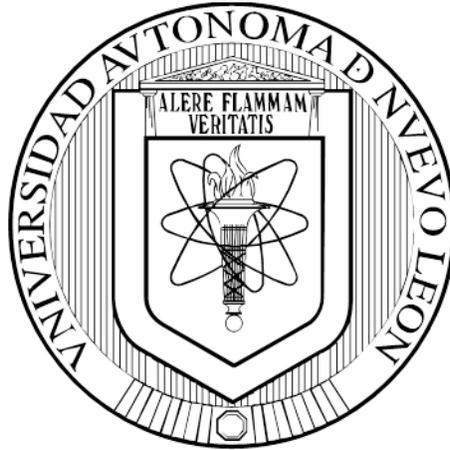
POR

ROLANDO ANTONIO SILVA PÉREZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

MARZO, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**FRECUENCIA DE NEOPLASIAS EN PERROS EN EL ÁREA
METROPOLITANA DE MONTERREY, N.L. Y COCCIDIOIDOMICOSIS
EN ALGUNOS CASOS CON SOSPECHA ORIGINAL DE NEOPLASIA.**

POR

ROLANDO ANTONIO SILVA PÉREZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO

MARZO, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

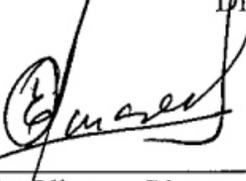
FRECUENCIA DE NEOPLASIAS EN PERROS EN EL ÁREA
METROPOLITANA DE MONTERREY, N.L. Y COCCIDIOIDOMICOSIS
EN ALGUNOS CASOS CON SOSPECHA ORIGINAL DE NEOPLASIA.

Aprobación de tesis por el comité particular de:

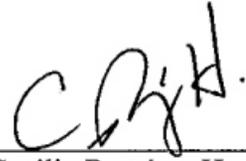
MVZ. Rolando Antonio Silva Pérez



PhD. Rafael Ramírez Romero
Director de Tesis



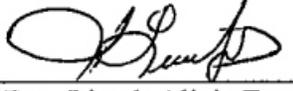
PhD. Emilio Olivares Sáenz
Co-Director



MCA. Cecilia Ramírez Hernández
Co-Directora



Dr. Jorge Lara Arias
Co-Director



Dra. Lizeth Alicia Fuentes Mera
Co-Directora

ESCOBEDO, N.L., MÉXICO

MARZO, 2017

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a mi asesor principal PhD. Rafael Ramírez Romero por su confianza, enseñanzas y apoyo en cada momento que lo necesité, no solo durante la maestría, sino también durante parte de mi licenciatura, le agradezco haberme inculcado y llenado de asombro con la maravillosa patología, porque no conocí otra rama de la medicina ni otro profesor que congeniaran tanto, que juntos inspiraran a llegar más alto y no conformarse con lo que se tiene o se ha logrado, sino esforzarse y no ser un simple estudiante, un simple médico o un simple maestro en ciencias. Gracias por esos momentos de diversión en los congresos y pláticas sobre todo, estudio, patología, valores, ciencia y hasta sobre la vida.

También quiero agradecer especialmente a la M.C. Cecilia Ramírez Hernández, ya que siempre estuvo para mí cuando tenía dudas o necesité algo, su apoyo me fue de mucha ayuda ya que era el contacto directo, rápido y conciso de consulta con mi asesor principal.

A mis co-asesores agradezco su apoyo con mis dudas, su orientación y sus enseñanzas, en especial al Dr. Jorge Lara Arias y a la Dra. Lizeth Alicia Fuentes Mera por la oportunidad de realizar esa estancia en el CIDICS y así permitirme aprender un poco de eso que siempre he considerado mi debilidad, Biología Molecular.

Agradezco a Selem Sared Torres Mendez y a Vanessa Pérez Silos por dejarme experimentar y arruinar sus experimentos una y otra vez, por aguantarme y ayudarme cuando tuve dudas.

A CONACyT por su apoyo económico en todo este tiempo, a la UANL y la FMVZ por su apoyo y orientación.

DEDICATORIA

Quiero dedicar todo este esfuerzo, las horas de trabajo y todo el agotamiento físico y mental especialmente a mis padres, Rolando Silva Morales y Armandina Pérez Martínez por siempre apoyarme y alentarme en mis estudios, porque siempre que los he necesitado han estado ahí para mí incondicionalmente sin importar cuál sea la situación, porque ellos han sido mi motor durante toda mi vida, han sido mis amigos, y mi más grande ejemplo de lucha incansable y porque cuando me he caído ellos me han levantado y me han empujado para llegar más lejos, porque sin ellos no sería ni la más mínima parte de la persona que soy.

A mis abuelas Ma. Antonia Morales Alanís y Evangelina Pérez Leal (Q.E.P.D.) porque con su cariño y amor siempre me han apoyado y siempre han velado porque siga creciendo, porque sé que esperan lo mejor de mí y gracias a eso me esfuerzo cada vez más, por sus cuidados y apoyo les dedico este trabajo.

Muy especialmente quiero dedicar este pequeño o gran esfuerzo a mi esposa Vanessa Pérez Silos, porque con su ejemplo de vida me ha demostrado que no importa desde donde empieces, lo importante es tener en mente hasta dónde quieres llegar, porque es el vivo ejemplo de que no importa cuántos obstáculos se te pongan enfrente, si tienes la determinación de seguir adelante lo lograrás.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xi
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Objetivo General	5
2.2. Objetivos Particulares.....	5
2.3. Hipótesis	5
2.4. Justificación.....	5
3. LITERATURA REVISADA	6
3.1. Coccidioidomicosis	6
3.1.1. Descubrimiento de la Coccidioidomicosis	6
3.1.2. Distribución Geográfica de la Coccidioidomicosis	7
3.1.3. Importancia de <i>Coccidioides spp.</i> como agente infeccioso	7
3.2. Neoplasias.....	8
3.2.1. Neoplasias en el Perro.....	9
3.2.2. Neoplasias y la Importancia en el Diagnóstico.....	10
3.3. Coccidioidomicosis en el Humano con Reporte Original de Neoplasia	11
3.3.1. Piel	11
3.3.2. Pulmones.....	12
3.3.3. Hueso	13
3.3.4. Linfoides.....	13
3.3.5. Gónadas	14
3.3.6. Sistema Nervioso	14
3.3.7. Cavidad Abdominal	15
3.4. Coccidioidomicosis en el Perro con Reporte Original de Neoplasia	15
3.4.1. Pulmones.....	15

3.4.2. Hueso	16
3.4.3. Linfoide.....	16
3.4.4. Sistema Nervioso	17
3.4.5. Gónadas.....	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1. Sitio de Obtención de Muestras.....	18
4.2. Periodo de Obtención de Muestras.....	18
4.3. Criterio de Inclusión de Muestras.....	18
4.4. Criterio de Exclusión de Muestras	19
4.5. Procesamiento de las Muestras.....	19
4.6. Observación de las Muestras	19
4.7. Recopilación de Datos.....	19
4.8. Detección Molecular	20
4.9. Extracción de ADN	21
4.10. Cuantificación de ADN.....	22
4.11. Realización de la PCR.....	23
4.12. Electroforesis.....	24
4.13. Pruebas Estadísticas	24
5. RESULTADOS.....	27
5.1. Grupo 1, Neoplasias	28
5.2. Grupo 2, No Neoplasias	33
5.3. Casos de Coccidioidomicosis con Diagnóstico Presuntivo de Neoplasia ..	34
5.3.1. Caso No. 1	34
5.3.2. Caso No. 2	36
5.3.3. Caso No. 3	38
5.3.4. Caso No. 4	40
5.4. Análisis Molecular.....	43
5.5. Análisis Estadístico	45
6. DISCUSIÓN	47

7. CONCLUSIÓN.....	50
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
9. RESUMEN BIOGRÁFICO	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Tabla de Contingencia 2x2, Ejemplo de diseño	24
Tabla 2.- Localización de Neoplasias por Sistemas	32
Tabla 3.- Tabla de contingencia 2x2, opinión del diagnóstico clínico/patólogo ..	45
Tabla 4.- Chi-cuadrada de Pearson, Relación de opiniones clínico/patólogo	46
Tabla 5.- Kappa de Cohen, Correlación del diagnóstico clínico/patólogo	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Incremento anual de biopsias remitidas.	27
Figura 2.- Mastocitoma	29
Figura 3.- Carcinoma mamario indiferenciado	30
Figura 4.- Cordoma	31
Figura 5.- Lesiones No Neoplásicas.....	33
Figura 6.- Caso 1, Osteítis granulomatosa por <i>Coccidioides spp.</i>	35
Figura 7.- Caso 2, Linfadenitis piogranulomatosa por <i>Coccidioides spp.</i>	37
Figura 8.- Caso 3, Dermatitis y periostitis granulomatosa severa por <i>Coccidioides spp.</i>	39
Figura 9.- Caso 4, Peritonitis granulomatosa crónica severa por <i>Coccidioides spp.</i>	42
Figura 10.- Amplificación de PCR punto final, <i>C. posadasii</i>	43
Figura 11.- Electroforesis en Gel de Agarosa, muestra 4.....	44

ABREVIATURAS

<i>spp.</i> :	Especies
<i>C. immitis</i> :	<i>Coccidioides immitis</i>
<i>C. posadasii</i> :	<i>Coccidioides posadasii</i>
AAF:	Aspirado de Aguja Fina
TAC:	Tomografía Axial Computarizada
RM:	Resonancia Magnética
L3:	Vértebra Lumbar No. 3
OSA:	Osteosarcoma
EE.UU.:	Estados Unidos
N.L.	Nuevo León
msnm:	Metros Sobre el Nivel del Mar
µm:	Micrómetros
µl:	Microlitros
nm:	Nanómetros
ng:	Nanogramos
nM:	Nanomoles
pmol:	Picomoles
ml.:	Mililitros
°C:	Grados Centígrdos
H&E:	Hematoxilina y Eosina
GMS:	Mentamina de Plata de Gomori (por sus siglas en inglés)
PAS:	Ácido Peryódico de Shiff (por sus siglas en inglés)
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
ADNg:	Ácido Desoxirribonucleico genómico
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés)

FFPE:	Fijado en Formalina Embebido en Parafina (por sus siglas en inglés)
FNW:	Agua Libre de Nucleasas (por sus siglas en inglés)
MgCl ₂ :	Cloruro de Magnesio
dNTP:	Desoxirribonucleótidos Trifosfato
dATP:	Desoxiadenosina Trifosfato
dCTP:	Desoxicitocina Trifosfato
dGTP:	Desoxiguanina Trifosfato
dTTP:	Desoxitimina Trifosfato
X:	Muestra
UV:	Ultravioleta
g:	Gravedades
χ^2 :	Chi-Cuadrada
gl:	Grados de Libertad
p:	Nivel de Significancia
κ :	Kappa de Cohen
C:	Clínico
P:	Patólogo
Σ :	Sumatoria de ...

1. RESUMEN

La coccidioidomicosis es una infección micótica respiratoria con diseminación sistémica ocasional. La coccidioidomicosis diseminada es considerada una enfermedad multifacética. En la medicina, la coccidioidomicosis diseminada se incluye dentro de un grupo de enfermedades infecciosas que se han referido como los grandes imitadores. En muchos casos, las neoplasias malignas se incluyen en el diagnóstico presuntivo. En medicina veterinaria, la coccidioidomicosis diseminada es común en perros. Sin embargo, a pesar de ser un dilema diagnóstico, coccidioidomicosis diseminada es subestimada y con frecuencia no se incluye en los diferenciales, incluso en zonas endémicas. En este trabajo se incluye un total de 688 biopsias remitidas, de las cuales se recopilieron 469 neoplasias y además 4 casos en especial de lesiones que fueron sospechosas de neoplasia, sin embargo, fueron causadas por *Coccidioides spp.* el cual, produce lesiones granulomatosas que crearon sospechas de neoplasias en cada caso durante el período enero 2010 hasta marzo 2016.

Abstract - Coccidioidomycosis is a respiratory fungal infection with occasional systemic dissemination. The disseminated coccidioidomycosis is considered a multifaceted disease. In medicine, disseminated coccidioidomycosis is included within a group of infectious diseases that have been referred as the great imitators. In many cases, malignancies are included in the presumptive diagnosis. In veterinary medicine, disseminated coccidioidomycosis is common in dogs. Nonetheless, despite of being a diagnostic dilemma, disseminated coccidioidomycosis is underestimated and frequently not included into differentials, even in endemic zones. A total of 688 biopsies were included in this study, of which 469 neoplasms were collected and 4 cases of lesions that were suspected to be neoplasia, however, were caused by *Coccidioides spp.* Which produces granulomatous lesions that created suspicions of neoplasms in each case during the period January 2010 to March 2016.

2. INTRODUCCIÓN

La coccidioidomicosis es una infección micótica respiratoria con diseminación sistémica ocasional. La coccidioidomicosis diseminada es considerada una enfermedad multifacética. Esta enfermedad es ocasionada por *Coccidioides spp.* el cual es un hongo dimórfico que habita en suelos de regiones con clima cálido, árido y desértico en el Hemisferio Occidental, la mayoría en el suroeste de EE.UU. y el norte de México (Llop-Hernández *et al.*, 2001; Carpenter *et al.*, 2010; Guimaraes *et al.*, 2013).

También se le conoce con el nombre de “Fiebre de Valle” (Hirschmann, 2007; Johnson *et al.*, 2014; Mitchell *et al.*, 2015), la infección lo causa la forma saprófita, del hongo llamada artroconidia que al diseminarse en el aire e introducirse al hospedero a través de las vías respiratorias, llegan a bronquiolos terminales y alveolos y comienzan un crecimiento y desarrollo hasta formar estructuras mayores denominadas esférulas, las cuales en su interior desarrollan diminutas estructuras conocidas como endoesporas que al romperse la esférula se diseminan y cada endoespora forma una nueva esférula (Hirschmann, 2007; Deus, 2009; Ramirez-Romero *et al.*, 2015)

Por lo general el sistema inmune retiene ésta infección a nivel pulmonar, sin embargo, en algunos casos como método de defensa el hongo produce una inflamación granulomatosa que se le ha denominado “coccidioidoma” (Sánchez-Hernández *et al.*, 2015), la cual es asintomática, alrededor del 1-5% de los casos, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos se desarrolla una infección diseminada a través de vía hematógena y/o linfática (Carpenter *et al.*, 2010), presenta especial predilección por infectar la piel y tejidos adyacentes, incluso infecta otros órganos como hígado, riñón, bazo (Hirschmann, 2007; Deus, 2009; Brown *et al.*, 2013), en algunas ocasiones causa también lesiones cardíacas y

oculares (Shubitz and Dial, 2005); aunque no es común la infección en hueso en humanos (Arora *et al.*, 2012), en perros presenta cierta predilección por éste tejido (Shubitz and Dial, 2005; Ramirez-Romero *et al.*, 2015).

En la medicina, la coccidioidomicosis diseminada se incluye dentro de un grupo de enfermedades infecciosas que se han denominado como los grandes imitadores. En muchos casos, las neoplasias malignas se incluyen en la el diagnóstico presuntivo (Hirschmann, 2007). Sin embargo, a pesar de ser un dilema su diagnóstico, la coccidioidomicosis diseminada es subestimada y con frecuencia no se incluye en los diferenciales, incluso en zonas endémicas.

Las neoplasias son sumamente relevantes tanto en la medicina como en medicina veterinaria. Incluso hoy en día que se emplean métodos moleculares para el diagnóstico, la patología es irremplazable para el diagnóstico de las neoplasias (J. Withrow and M. Vail, 2007; Rosai, 2007). La interpretación de laminillas sin duda es el método más útil y preciso para el diagnóstico de las neoplasias.

Las neoplasias deben diferenciarse de otros aumentos de volumen tisulares mediante estudio citohistológico, análisis que permite además caracterizar el comportamiento biológico benigno o maligno, constituyendo un complemento fundamental a estudios hematológicos, serológicos, radiográficos, incluso de microscopía electrónica, citoenzimológicos e inmunohistoquímicos (Ildefonso-Cruz, 1997).

El médico se apoya en el patólogo para determinar un mejor diagnóstico en cuanto a neoplasias (Ildefonso-Cruz, 1997; Rosai, 2007). Por otra parte, la histopatología se ha señalado como una herramienta de gran utilidad, la cual puede orientar en caso de una presunción equivocada como en el caso de las lesiones de tipo neoplasia causadas en la coccidioidomicosis diseminada (Caraway *et al.*, 2003; Rosai, 2007).

2.1. Objetivo General

Caracterizar histopatológicamente las lesiones con diagnóstico presuntivo de neoplasia de biopsias remitidas a patología, las cuales sean ocasionadas verdaderamente por coccidioidomicosis diseminada.

2.2. Objetivos Particulares

- Clasificar y determinar aquellas lesiones remitidas con sospecha de neoplasia, que en histopatología correspondan a coccidioidomicosis diseminada.
- Determinar la neoplasia de mayor frecuencia, así como el sistema con mayor presencia de neoplasias.
- Determinar las especies de *Coccidioides* (*C. immitis* y/o *C. posadasii*) involucradas en cada caso, mediante ensayos de PCR punto final a partir de tejidos Fijados en Formalina Embebidos en Parafina (FFPE).

2.3. Hipótesis

Las lesiones ocasionadas por coccidioidomicosis diseminada generan confusión en el diagnóstico originando sospecha de neoplasia por parte del clínico.

2.4. Justificación

La coccidioidomicosis diseminada produce lesiones proliferativas similares a neoplasias, éste tipo de lesiones generan conflicto en el diagnóstico puesto que rara vez se toma en cuenta a *Coccidioides spp.* como agente causal, a pesar de que Nuevo León ha sido reportado como una zona de alta endemicidad.

3. LITERATURA REVISADA

3.1. *Coccidioidomycosis*

Esta enfermedad es considerada una de las micosis sistémicas más antiguamente reportadas y se considera una de las enfermedades fúngicas más altamente infectivas (Posadas, 1892; Garcia-Garcia *et al.*, 2015), también es conocida con el nombre de “Fiebre de Valle”, debido a que un sitio altamente endémico y donde se diagnosticó por primera vez fue en el Valle de San Joaquín en California (Baptista and Riquelme, 2007; Negroni, 2008), la infección lo causa la forma saprófita, del hongo *Coccidioides spp.* llamada artroconidia, las cuales son conidias septadas y articuladas que al desarticularse se diseminan a través del aire y se introducen al hospedero a través de las vías respiratorias, llegan a bronquiolos y alveolos terminales y comienzan su crecimiento y desarrollo hasta formar estructuras mayores denominadas esférulas, estas estructuras pueden variar en un diámetro desde 20 a 100 μ m, las cuales en su interior desarrollan diminutas estructuras conocidas como endoesporas que miden desde 2 a 5 μ m, que al romperse la esférula se diseminan y cada endoespora comienza un nuevo desarrollo hasta lograr formar una nueva esférula y así continua con este ciclo dentro del organismo (Wolbach, 1904; Shubitz and Dial, 2005; Deus, 2009; Johnson *et al.*, 2014).

3.1.1. *Descubrimiento de la Coccidioidomycosis*

Alejandro Posadas (1892) reportó por primera vez la coccidioidomycosis al tratar a un soldado el cual presentaba una historia clínica recurrente de neoplasias, Posadas, con el apoyo del patólogo Robert Wernicke, describieron a un parásito desconocido que era similar a especies del orden *Coccidia* pertenecientes al reino *Protozoa*; Este agente por su similitud con las *Coccidias* fue denominado *Coccidioides immitis*. Sin embargo, no fue hasta 1900 que fue descrita su verdadera

naturaleza y se le denominó dentro del reino *Fungi* puesto que al ser sometido a cultivo se observó un crecimiento de la misma forma que la mayoría de los hongos, de un color blanquecino de forma algodonosa.

Hasta ahora se han reportado dos especies causantes de la coccidioidomicosis, *Coccidioides immitis*, el cual es principalmente endémica de California, por lo cual a menudo es referida como la cepa californiana y *Coccidioides posadasii*, esta especie se encuentra mayormente en Arizona y se le refiere como la cepa no-californiana para distinguírsele de *C. immitis* (Aviles-Salas, 2007; Negroni, 2008).

3.1.2. *Distribución Geográfica de la Coccidioidomicosis*

La coccidioidomicosis es una infección micótica primariamente pulmonar con diseminación sistémica ocasional. La coccidioidomicosis diseminada es considerada una enfermedad multifacética. Esta enfermedad es ocasionada por *Coccidioides spp.* el cual es un hongo dimórfico que habita en suelos (Gautam *et al.*, 2013), a no más de 30cm. (Hector *et al.*, 2011) de profundidad de regiones con clima cálido, árido y desérticos cuyo promedio de precipitación anual es menor a los 500 mm. Y altitud es menor a los 800 metros sobre el nivel del mar en el Hemisferio Occidental, la mayoría en el suroeste de EE.UU. y el norte de México (Galgiani, 1993; Lopes-Colombo *et al.*, 2011).

3.1.3. *Importancia de Coccidioides spp. como agente infectivo*

En la medicina, la coccidioidomicosis diseminada se incluye dentro de un grupo de enfermedades infecciosas que se han denominado como los “grandes imitadores”. En muchos casos, las neoplasias se incluyen en dentro del diagnóstico presuntivo. Sin embargo, a pesar de ser un dilema su diagnóstico, la coccidioidomicosis diseminada es subestimada y con frecuencia no se incluye en

los diagnósticos diferenciales, incluso en zonas endémicas (*Crum, 2005; Chen et al., 2010; Ramirez-Romero et al., 2015*)

La coccidioidomicosis es una enfermedad que presenta signos muy generales y nada específicos, que van desde fiebres recurrentes, tos, estornudos, hasta pérdida de peso progresiva, emaciación generalizada entre otros (*Shubitz and Dial, 2005; Chen et al., 2010*). En una etapa inicial el hongo se establece en pulmón a nivel de alveolos terminales, donde puede ser contenido por el mismo organismo y algunas veces produce granulomas denominados “coccidioidomas” (*Polesky et al., 1999; Sánchez-Hernández et al., 2015*), sin embargo, en ciertos casos el hongo se disemina de forma sistémica a través de vía hematógica y/o linfática hacia diversos órganos de igual manera produciendo lesiones poco características y que pudieran verse enmascaradas al igual que los signos con diversas enfermedades, entre las que destacan tuberculosis, dermatitis (*Gaidici and Saubolle, 2009*), osteomielitis, lesiones por otros hongos como *Blastomyces* (*Parker et al., 2013*), *Paracoccidioides* (*de Farias et al., 2011*) e incluso por algunas algas como *Chlorella* (*Quigley et al., 2009*) y *Prototheca* (*Vince et al., 2014*), sin embargo, se asocia más frecuentemente y en mayor cantidad de órganos con neoplasias por su crecimiento y tipo de inflamación, produciendo granulomas que llegan a ulcerarse y crecen de forma irregular (*Guarner and Brandt, 2011*).

3.2. Neoplasias

Ildefonso (1997) define una neoplasia como “un proceso patológico caracterizado por una excesiva proliferación celular indefinida e independiente de los mecanismos de control inhibitorios normales. Este nuevo crecimiento celular determina la formación de un aumento de volumen, clínicamente conocido como tumor o masa, con velocidades de crecimiento intra e interneoplásico variables, de los que depende el comportamiento biológico benigno o maligno de las neoplasias”.

Las neoplasias carecen completamente de finalidad alguna, incluso, de acuerdo al grado de diferenciación, las células neoplásicas pueden conservar su función bioquímica original o adquirir nuevas funciones (Ildefonso-Cruz, 1997). Esta característica determina algunos de los diversos signos y/o síndromes paraneoplásicos asociados con este tipo de trastornos, que incluso en ocasiones conllevan un mayor riesgo para el paciente que el propio proceso neoplásico como tal (Ziller-Ortiz, 2004; Rowell et al., 2011; de Vivero *et al.*, 2013).

3.2.1. Neoplasias en el Perro

Las lesiones neoplásicas son de gran importancia dentro de la medicina, puesto en la medicina veterinaria de pequeñas especies. El perro puede presentar una gran variedad de lesiones neoplásicas en sus diferentes sistemas corporales (tegumentario, musculoesquelético, linfoide, etc.). Los signos que se presentan en el perro son muy variables, sin embargo, si se logra diagnosticar oportunamente y se tratan temprana y adecuadamente, el pronóstico suele ser muy favorable (Ildefonso-Cruz, 1997; Dobson *et al.*, 2002; Carpio-Alemán *et al.*, 2013).

Los perros son un excelente modelo para el estudio de las neoplasias, ya que ellos presentan este tipo de padecimiento de forma natural, al igual que los humanos. Histológicamente, las neoplasias se presentan de forma similar en ambas especies, inclusive ambos responden de manera similar a los tratamientos, aunque por lo general esta enfermedad se presenta de forma más agresiva en perros, no se ha determinado si en verdad, es más agresiva que en humanos (Rowell *et al.*, 2011).

La incidencia de neoplasias en perros es desconocida, sin embargo, algunos autores han estimado que aproximadamente uno de cada 10 perros desarrollará una lesión de tipo neoplásica a lo largo de su vida natural (de Vivero *et al.*, 2013). Los perros, al igual que los humanos y otros animales son susceptibles a padecer este

tipo de alteraciones, aunque, este tipo de lesiones presentan biología y comportamiento similar, incluso mismas aberraciones genéticas tanto en el perro como en el humano (Rowell *et al.*, 2011), las neoplasias en perros son más frecuentes que en el humano (Meuten, 2002), un ejemplo de esto es el osteosarcoma (OSA), el cual se ha reportado una incidencia 20 veces mayor en perros que en humanos (Rowell *et al.*, 2011).

En caninos, las neoplasias de origen epitelial son las de mayor presencia, entre los cuales destacan la piel es, que es el órgano más afectado por éste tipo de lesiones (Mendonça-Bellei *et al.*, 2006; Dennis *et al.*, 2011), seguido por la glándula mamaria (Kelsey *et al.*, 1998; Ziller-Ortiz, 2004). Además, el mastocitoma es una neoplasia maligna de origen mesenquimal (Wu and Hochman, 2009; Carpio-Alemán *et al.*, 2013), ésta es la neoplasia de piel más común en perros adultos mayores a 5 años de edad (Ildefonso-Cruz, 1997; Dobson *et al.*, 2002; Dobson, 2013; Eleni *et al.*, 2014).

En el humano, las neoplasias de glándula mamaria son la neoplasia más frecuente, seguida por carcinomas de pulmón, intestino y próstata, aunque estas últimas no son comunes en el perro, las neoplasias de glándula mamaria se encuentran entre las más frecuentes en esta especie (Dobson *et al.*, 2002).

3.2.2. *Neoplasias y la Importancia en el Diagnóstico*

La pérdida de peso y caquexia son otros signos asociados al padecimiento de las neoplasias, estos se atribuyen al activo y continuo metabolismo de la neoplasia, la cual disminuye la disponibilidad de ciertos metabolitos para el huésped, además de que su actividad enzimática es interferida la mayoría de las veces por los metabolitos neoplásicos circulantes, además de la anorexia asociada y modificaciones en la absorción intestinal. La emaciación extrema, la cual es común

en humanos, es raramente observada en los animales, esto debido a que muchos pacientes son eutanasiados en fases tempranas de la enfermedad y no alcanzan a desarrollar las fases críticas (Larizza *et al.*, 2005; Shubitz and Dial, 2005; Graupmann-Kuzma *et al.*, 2008).

Las neoplasias en el perro, tienen además algunos aspectos relevantes, ya que existe una creciente relación afectiva entre las personas y sus mascotas (perros y gatos principalmente), esto se relaciona con una mejor relación del médico veterinario con el dueño de la mascota; además, al recibir atención por parte del veterinario, los perros alcanzan edades más avanzadas, en las cuales las neoplasias son más frecuentes, inclusive, existen mayores posibilidades para la realización de exámenes citológicos e histopatológicos (Ildefonso-Cruz, 1997; J. Withrow and M. Vail, 2007), además de un aumento del interés en el estudio de este tipo de padecimientos, lo que conlleva a la necesidad de un mayor número de especialistas para su diagnóstico, por lo tanto, se genera una creciente en el número de patólogos veterinarios.

Inclusive en estos tiempos en los que los procedimientos moleculares se emplean en diagnóstico, la patología quirúrgica es considerada la piedra angular en el procedimiento diagnóstico de las neoplasias, tanto en medicina como en medicina veterinaria (J. Withrow and M. Vail, 2007; Rosai, 2007).

3.3. Coccidioidomycosis en el Humano con Reporte Original de Neoplasia

3.3.1. Piel

Después de que se describió el primer caso de coccidioidomycosis por Posadas en 1892, el cual fue con sospecha de una *Mycosis fungoides*, el primer reporte en humanos de coccidioidomycosis diseminada con un diagnóstico previo de

neoplasia fue hecho por Schwartz and Lamberts (1981), quienes reportaron un paciente con un nódulo con hiperqueratosis en el cuero cabelludo, del cual se sospechaba de un tumor de células escamosas. Crum (2005) describió un caso de una mujer con síntomas similares a un resfriado y que presentaba nódulos en la región intertriginosa del seno izquierdo de la cual se sospechaba de *Mycosis fungoides* al igual que Posadas.

3.3.2. Pulmones

La coccidioidomicosis ha sido reportada como un agente involucrado en sospechas de neoplasias primarias en pulmón, en un estudio realizado por Guimaraes *et al.* (2013) en donde se incluyeron 27 pacientes con infección micótica de diversas naturalezas, las cuales fueron enmascaradas por neoplasias primarias pulmonares o en algunos casos por metástasis, 6 pacientes (22.2%) fueron positivos a coccidioidomicosis, solamente superados por histoplasmosis con 7 pacientes (25.9%). Se han reportado otros casos con sospecha original de neoplasias pulmonares (Petrini *et al.*, 2003), y en la mayoría de los casos se describen síntomas similares a los de un resfriado, con fiebre recurrente, tos, pérdida de peso y en algunos casos hemoptisis.

Stieglitz *et al.* (2014) reportó un caso de coccidioidomicosis pulmonar con sospecha original de metástasis de un sarcoma de Ewing ubicado en pelvis, se administró quimioterapia como tratamiento, pero solo redujeron las lesiones en pelvis, sin embargo, las lesiones en pulmón continuaban, se diagnosticó *Coccidioides immitis* mediante cultivo.

3.3.3. Hueso

El tejido óseo es otro de los sitios de asentamiento para *Coccidioides spp.* en una fase diseminada, a pesar de no ser un sitio de predilección e inclusive es rara su presentación en este tejido, existen varios reportes de infecciones en hueso, la biopsia es una técnica de gran utilidad para el diagnóstico de osteomielitis coccidioidal que pudiera estar encubierta en primera instancia como una neoplasia ósea (Caraway *et al.*, 2003). La coccidioidomicosis en hueso se ha reportado desde lesiones en metacarpos con sospecha de encondroma (Huang *et al.*, 2000), se ha reportado incluso en la cresta iliaca con sospecha de un linfoma o un sarcoma de Ewing (Smitherman K, 2014), existe un reporte de una lesión en clavícula con presencia de exudado fibrinopurulento (Arora *et al.*, 2012) y existe reporte de sospecha de una neoplasia ósea primaria ósea en patela (Li *et al.*, 2014), en todos los casos anteriores se realizó biopsia del tejido y se diagnosticó al observar las esférulas del hongo mediante histopatología. En cambio existe un reporte de una osteomielitis causada por la infección de *C. immitis*, la cual se sospechó de primera instancia de una neoplasia primaria en hueso, este diagnóstico se llevó a cabo mediante Aspirado de Aguja Fina (AAF) y estudio histopatológico donde se encontró inflamación, necrosis y una raras esferas esférulas que fueron identificadas con tinción de metamina de plata de Gomori (GSM), posteriormente se confirmó la infección por *C. immitis* a través de cultivo (Caraway *et al.*, 2003).

3.3.4. Linfoide

En México existe un reporte de un hombre con lesiones tumefactas a nivel cervical, donde se sospechaba de una adenopatía, específicamente se menciona un diagnóstico de linfoma no Hodgkin, una de estas estructuras, la más grande, con un diámetro de 3 centímetros fue referida a patología, donde se diagnosticó coccidioidomicosis al encontrar las estructuras correspondientes con *Coccidioides*

immitis dentro de los granulomas presentes en la lesión examinada (Aviles-Salas, 2007). En California se realizó otro reporte similar con diagnóstico de linfoma, sin embargo, las lesiones de este paciente se localizaban a nivel de ganglios inguinales, además de presentar lesiones en pulmones, piel y tórax anterior (Cannella and Vinetz, 2014).

3.3.5. Gónadas

En el tracto reproductivo tanto del masculino como del femenino se han reportado infecciones por *Coccidioides spp.* Halsey *et al.* (2005) reportó el caso de un hombre de 53 años, el cual presentaba concentraciones persistentemente elevadas del antígeno prostático, por lo que se decidió tomar biopsia de la próstata a pesar de no notarse nódulos al tacto, en el estudio histopatológico se reveló una inflamación granulomatosa que envolvía estructuras esféricas con una delgada pared birrefringente, concordante con *Coccidioides spp.* Ellis *et al.* (2004) describe el caso de una mujer de 42 años, la cual se le había realizado una ooforectomía unilateral y presentaba aumento de la circunferencia abdominal, dolor, menstruación irregular y algunos otros síntomas, se realizó ultrasonido abdominal encontrando ascitis y una masa hiperecogénica en el ovario derecho, por lo que se procedió a retirarlo en su totalidad, en el estudio histopatológico se aprecia una esférulas de *C. immitis* dentro de un granuloma no supurativo.

3.3.6. Sistema Nervioso

Komotar y Clatterbuck (2003) reportó el caso de una mujer de 38 años con historia previa de coccidioidomicosis, la cual fue tratada y dos años después presentaba episodios de cefalea intensa, se realizó Tomografía Axial Computarizada (TAC) y se observó una masa a nivel de meninges a pesar de que se sospechaba de una inflamación dural crónica a causa de coccidioidomicosis

puesto que los títulos en suero se elevaron, el diagnóstico presuntivo fue meningioma en placa, se procedió a tomar biopsia y en la evaluación histopatológica se determinó una inflamación granulomatosa a causa de una coccidioidomicosis latente.

3.3.7. Cavity Abdominal

Cavity abdominal es otro sitio donde se ha localizado lesiones por coccidioidomicosis diseminada, un reporte de un hombre de 23 años con historia de coccidioidomicosis meningeal, el cual no respondió adecuadamente al tratamiento antimicótico, presentaba dolor y abultamiento en abdomen, procedió a realizarse una TAC donde se observaron estructuras de tipo quísticas en cavity peritoneal alrededor del espacio perihepático, canales paracólicos y pelvis, los cuales se punzaron mediante un AAF guiado con TAC, y se diagnosticó coccidioidomicosis al revelar estructuras características del hongo (esférulas), así mismo procedió a realizarse un cultivo para su identificación, el cual fue concordante con *C. immitis* (Eyer *et al.*, 2004).

3.4. Coccidioidomicosis en el Perro con Reporte Original de Neoplasia

3.4.1. Pulmones

En el perro la coccidioidomicosis se llega a presentar de la misma forma, ya que presenta el mismo ciclo que inicia con la infección primaria a nivel pulmonar y posterior diseminación sistémica alcanzando diversos órganos. Shubitz y Dial (2005) reportan el caso de un perro el cual presentaba infección por *Coccidioides spp.* a nivel pulmonar el cual presentaba fiebres recurrentes durante el último mes y en las últimas horas disnea y malestar general, en la radiografía se aprecia efusión pleural, infiltrado intersticial central y linfadenopatía hilar. El perro no presentaba

episodios de tos, inclusive, se habían tomado radiografías 2 y 4 semanas antes donde no se observaron alteraciones y la prueba serológica dio negativo a *Coccidioides spp.* El diagnóstico se llevó a cabo al obtener un aspirado de un piogranuloma mediante toracocentesis el cual dio positivo mediante citología a estructuras fúngicas y en cultivo se confirmó la presencia de *Coccidioides spp.*

3.4.2. Hueso

En este mismo reporte se incluye el caso de un perro con dolor en el dorso, paresia posterior y ataxia y en la radiografía se aprecia lisis de L3 con pérdida de la pared ventral del canal espinal. El paciente fue negativo a anticuerpos coccidioidales, y dentro de los diagnósticos diferenciales se incluyeron neoplasia y osteomielitis micótica y bacteriana, se tomó biopsia y a la histopatología y cultivo resultó positivo a *Coccidioides spp.* (Shubitz and Dial, 2005)

3.4.3. Linfoide

Jeroski (2003) describe el caso de un perro de 11 años de edad, el cual fue tratado con antimicóticos sistémicos por osteomielitis coccidioidal, al séptimo día de tratamiento se observó linfadenomegalia del ganglio poplíteo derecho, por lo que se procedió a tomar biopsia. La biopsia fue remitida con sospechas de linfosarcoma y en menor sospecha de linfadenitis granulomatosa, el cual en histopatología se observaron esférulas con una pared gruesa rodeadas de macrófagos reactivos, las cuales formaban granulomas, dando como diagnóstico definitivo linfadenitis por *Coccidioides immitis*.

3.4.4. Sistema Nervioso

Un grupo de perros y gatos fueron sometidos a un estudio para determinar las características de granulomas solitarios ocasionados por *Coccidioides spp.* mediante el uso de la Resonancia Magnética (RM), los cuales presentaron resultados muy similares entre ellos con lesiones encontradas tanto en cerebro como en médula espinal, sin embargo, se hace mención que para lograr un diagnóstico adecuado de coccidioidomicosis es indispensable y de suma importancia realizar estudios citológicos y/o histopatológicos (Bentley *et al.*, 2015).

3.4.5. Gónadas

El primer caso de coccidioidomicosis en el perro en México fue identificado en un caso que después de presentar un cuadro crónico de caquexia y linfadenopatía, desarrolló aumento de tamaño de testículos y se sospechó originalmente de una neoplasia testicular; sin embargo, resultó orquitis granulomatosa por *Coccidioides*. La muerte posterior del animal confirmó una coccidioidomicosis diseminada (Ramírez-Romero *et al.*, 1991).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio no fue requerida la autorización ni el empleo de ningún protocolo de algún comité sobre el cuidado y uso de animales para experimentación, debido a que en ninguno de los casos mencionados se utilizaron o muestrearon los animales por nuestra cuenta, se trabajó únicamente con las biopsias (patología quirúrgica) de estos animales, las biopsias fueron obtenidas mediante protocolos ya establecidos de cirugía y toma de muestras para estudios histopatológicos.

4.1. Sitio de Obtención de Muestras

Las muestras fueron obtenidas a partir de las muestras (biopsias) remitidas por parte de las clínicas veterinarias dentro del área metropolitana de Monterrey, N.L., cuya información del punto central corresponde a las siguientes coordenadas: Oeste $100^{\circ}18'39.30''$; Norte $25^{\circ}42'38.01''$; altura 520 msnm.

4.2. Periodo de Obtención de Muestras

El periodo de obtención de muestras fue el periodo comprendido dentro de enero del 2010 hasta marzo del 2016, en donde se incluyeron las muestras remitidas al Laboratorio de Patología Diagnóstica Veterinaria (laboratorio de patología veterinaria privado).

4.3. Criterio de Inclusión de Muestras

Se incluyeron todas aquellas biopsias remitidas por parte del clínico que dentro de su historia clínica presentaban un diagnóstico original de neoplasia.

4.4. Criterio de Exclusión de Muestras

Se excluyeron todas aquellas biopsias que dentro de su historia clínica presentaba un diagnóstico distinto a una neoplasia.

4.5. Procesamiento de las Muestras

Las muestras fueron procesadas en su totalidad en el departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León mediante el empleo de la técnica rutinaria de histopatología (fijación, deshidratación, aclaramiento, infiltración e inclusión en parafina) las cuales posteriormente fueron cortadas a un grosor de 4µm. (Prophet, 1995) y teñidas rutinariamente con Hematoxilina y Eosina (H&E); Además se realizaron tinciones especiales como ácido periodico de Shiff (PAS) y metamina de plata de Gomori (GMS), entre otras, para determinar la verdadera naturaleza de la lesión y en caso de ser necesario para realizar una mejor descripción.

4.6. Observación de las Muestras

Las muestras que son incluidas dentro de este trabajo, las cuales formaron un total de 688 biopsias, fueron absolutamente todas diagnosticadas por el patólogo a cargo del laboratorio, el cual determinó si las biopsias eran positivas o negativas a coccidioidomicosis diseminada, y en caso de ser neoplasia, se determinó el tipo, estirpe y grado de la neoplasia.

4.7. Recopilación de Datos

El material colectado incluye una detallada historia clínica, fotografías macroscópicas en caso de que se hayan tomado, la descripción histopatológica, las

microfotografías correspondientes y la discusión de cada caso positivo a coccidioidomicosis diseminada.

Se incluyeron también algunas tablas, gráficas y fotografías generales representativas de las biopsias positivas a neoplasias verdaderas, esto con el fin de resumir y resaltar los detalles anexos e importantes de aquellas lesiones que no resultaron positivas a coccidioidomicosis diseminada.

Se realizó además la respectiva descripción en cuanto a las características tanto micro como macroscópicas de las lesiones y se estableció conforme a la literatura especializada de neoplasias y lesiones semejantes de acuerdo con lo descrito en patología de humanos.

4.8. Detección Molecular

Se realizaron ensayos de PCR a cada una de las muestras que resultaron positivas a coccidioidomicosis diseminada a través de histopatología, el ADN será extraído a partir de los tejidos embebidos en parafina empleando el kit ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Promega Corp.). Se utilizó un par de primers anteriormente reportados Coi9-1F (5'-TACGGTGTAATCCCGATACA-3') y Coi9-1R (5'-GGTCTGAATGATCTGACGCA-3'), al igual que el protocolo de la PCR (Umeyama *et al.*, 2006). La PCR se utilizó como apoyo para la identificación entre las dos especies, *C. immitis* y *C. posadasii*, las cuales se tomarán diagnósticos positivos al presentar amplicones de 720 pb y 634 pb respectivamente (Umeyama *et al.*, 2006).

4.9. Extracción de ADN

El protocolo de extracción que se siguió fue referido dentro del kit de extracción ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Promega Corp.) para tejidos fijados con formalina y embebidos en parafina.

A partir de muestras embebidas en parafina, se les retiró la mayor cantidad de parafina posible para al momento de hacer los cortes estos presentaran la menor contaminación posible por parafina. Se realizó una recopilación de cortes que al juntarlos sumaban un aproximado de 50-100 μm de grosor, los cuales se recopilaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml. para cada muestra, las cuales fueron sometidas al mismo método de extracción:

- Añadir 500 μl de aceite mineral.
- Incubar a 80°C por 1 minuto.
- Mezclar con Vortex.
- Añadir 200 μl . de Lysis Buffer.
- Centrifugar a 10,000 x g por 15 segundos. Se formarán dos fases, fase superior (oleosa) y fase inferior (acuosa).
- Añadir 20 μl de Proteinase K directamente en la fase baja y mezclar con pipeteo.
- Incubar a 56°C por 1 hora.
- Incubar a 80°C por 1 hora
- Enfriar y centrifugar a 10,000 x g por 30 segundos.
- Añadir 10 μl de RNase directamente en la fase acuosa y mezclar con pipeteo.
- Incubar a 20-25°C por 5 minutos.
- Añadir 220 μl de BL Buffer.
- Añadir 240 μl de etanol absoluto.
- Mezclar con Vortex.

- Centrifugar a 10,000 x g por 15 segundos.
- Transferir la muestra (sólo la fase acuosa) a una columna de extracción con tubo colector.
- Centrifugar el ensamblado a 10,000 x g por 30 segundos y descartar lo recolectado.
- Añadir 500µl de la solución de lavado (preparada con etanol) a la columna y taparla. Centrifugar a 10,000 x g por 30 segundos y descartar lo recolectado.
- Añadir 500µl de la solución de lavado a la columna y taparla. Centrifugar a 10,000 x g por 30 segundos y descartar lo recolectado.
- Centrifugar el ensamblado a 16,000 x g durante 3 minutos sin tapar el tubo para secar la muestra.
- Transferir la columna a un tubo Eppendorf nuevo de 1.5ml. añadir 30µl de Buffer de Elusión, tapar la columna y centrifugar a 16,000 x g durante un minuto.
- Remover la columna y almacenar el ADN contenido en el tubo de 1.5ml. en congelación -20°C.

4.10. Cuantificación de ADN

El método de cuantificación de ADN que se utilizó fue mediante el empleo del NANODrop 2000 Thermo Fisher Scientific TM, el cual es un espectrofotómetro que mide amplitudes de onda de luz UV y a través de la absorbancia determina concentraciones de ácidos nucleicos determina además la pureza de la muestra comparándola con distintas longitudes de ondas. La concentración de las muestras se determinó en ng/µl, y se determinó además su pureza para corroborar la correcta técnica de extracción.

Los ácidos nucleicos tienen una absorbancia máxima de 260nm, es por esto que se emplean 2 ratios para valorar la pureza de los ácido nucleicos, 260/280 en el cual se espera un rango superior a 1.8, si se obtienen resultados menores, significa que existe contaminación con proteínas y/o fenol. 260/230, este rango se espera encontrarse entre 2.0 y 2.2, de lo contrario sugiere residuos de fenol, guanidina o glicógeno, señala también contaminación con parafina.

4.11. Realización de PCR

Para la realización de la PCR se utilizaron los siguientes reactivos con las dosis señaladas, las dosis que variaron fueron las del ADN genómico (ADNg) de la muestra y el Agua Libre de Nucleasas (ALN) para completar 10µl en cada caso:

- ADNg (dependiendo concentraciones, 100ng/µl mínimo).
- PCR Master Mix (2X) Thermo Fisher Scientific™ (5.0 µl).
 - Taq DNA polymerase (0.05 U/µl)
 - Buffer de reacción
 - MgCl₂ 4mM
- 0.4 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)
- Primers 20pmol/µl (0.5 µl).
- Agua Libre de Nucleasas (hasta completar 10µl).

Una vez con los reactivos listos para la PCR se procedió con el protocolo previamente reportado: un ciclo a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 45 segundos, con un paso final a 72°C por 3 minutos (Umeyama *et al.*, 2006).

4.12. *Electroforesis*

Se realizó electroforesis en gel de agarosa para identificación de amplicones mediante fluorescencia. El gel de agarosa se preparó al 1% con bromuro de etidio al 0.003%, el cual es un agente intercalante con el ADN, el cual emite una luz en presencia de la luz UV y permite observar el ADN con ayuda de un transiluminador UV.

4.13. *Pruebas Estadísticas*

Los datos obtenidos en cuando al número de las muestras (biopsias) se distribuyeron en una tabla de contingencia de 2x2 para su posterior interpretación, se designaron cuatro cuadrantes de acuerdo a la opinión del clínico y el patólogo: **A** (C+,P+), **B** (C-,P+), **C** (C+,P-) y **D** (C-,P-), como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Tabla de Contingencia 2x2, Ejemplo de diseño

	C+	C-	Σ (P)
P+	A	B	A+B
P-	C	D	C+D
Σ (C)	A+C	B+D	Σ (C,P)

En donde:

C+ = diagnóstico positivo a neoplasia por parte del clínico

C- = diagnóstico negativo a neoplasia por parte del clínico

P+ = diagnóstico positivo a neoplasia por parte del patólogo

P- = diagnóstico negativo a neoplasia por parte del patólogo

El análisis de los datos se llevará a cabo mediante una prueba de χ^2 (Chi-cuadrada) con un intervalo de 95% para determinar la relación sobre la opinión tanto del clínico como del patólogo, para rechazar la hipótesis (H_0), la cual indica que divergen por completo en su opinión en cuanto al diagnóstico de neoplasias, utilizando la siguiente fórmula:

$$\chi^2 = \sum \frac{(fo - fe)^2}{fe}$$

En donde:

χ^2 = Chi-cuadrada

Σ = sumatoria de ...

fo = frecuencia observada

fe = frecuencia esperada

Posteriormente al ser datos cualitativos, se realizó una prueba de κ (Kappa de Cohen) para determinar la concordancia que existe entre el diagnóstico clínico y el diagnóstico por parte del patólogo en el cual, si ambos están de acuerdo, entonces $\kappa = 1$, por el contrario, si están completamente en desacuerdo, $\kappa = 0$, este valor será determinado mediante la siguiente fórmula:

$$\kappa = \frac{\mathbf{Pr}(a) - \mathbf{Pr}(e)}{1 - \mathbf{Pr}(e)}$$

En donde:

κ = coeficiente Kappa de Cohen

$\mathbf{Pr}(a)$ = concordancia observada

$\mathbf{Pr}(e)$ = concordancia atribuible al azar

Además serán incluidos algunos datos, gráficos y tablas relacionados con las neoplasias encontradas mayormente, los sistemas correspondientes y más afectados y algunas otras lesiones que confunden el diagnóstico y asimilaren ser neoplasias.

5. RESULTADOS

Se recopilaron un total de 688 muestras, las cuales presentaron un incremento anual exponencial en el número de biopsias remitidas por parte de los clínicos para análisis histopatológico, obteniéndose así las siguientes cifras: 2010 (6 biopsias), 2011 (11 biopsias), 2012 (28 biopsias), 2013 (81 biopsias), 2014 (224 biopsias), 2015 (266 biopsias) y 76 biopsias hasta marzo del 2016 (Figura 1), de las cuales 270 (39.2%) se presentaron en machos, 409 (59.5%) en hembras y 9 (1.4%) el sexo no fue incluido en la historia clínica. De igual manera se observó que las razas más afectadas por las neoplasias en este trabajo fueron el Chihuahua con 69 casos (10.1%), seguido por el Labrador con 61 casos (8.8%) y el Schnauzer y los perros criollos con 53 casos (7.7%) cada uno. En cuanto a las edades, fueron divididos en rangos 1 (< 3 años), 2 (3 < 6 Años), 3 (6 < 9 años), 4 (9 < 12 años) y 5 (\geq 12 años), de los cuales los perros comprendidos en el rango 3 y 4 presentaron las mayores tasas de presencia anual de neoplasias con 172 casos (25%) y 167 casos (24.3%) respectivamente.

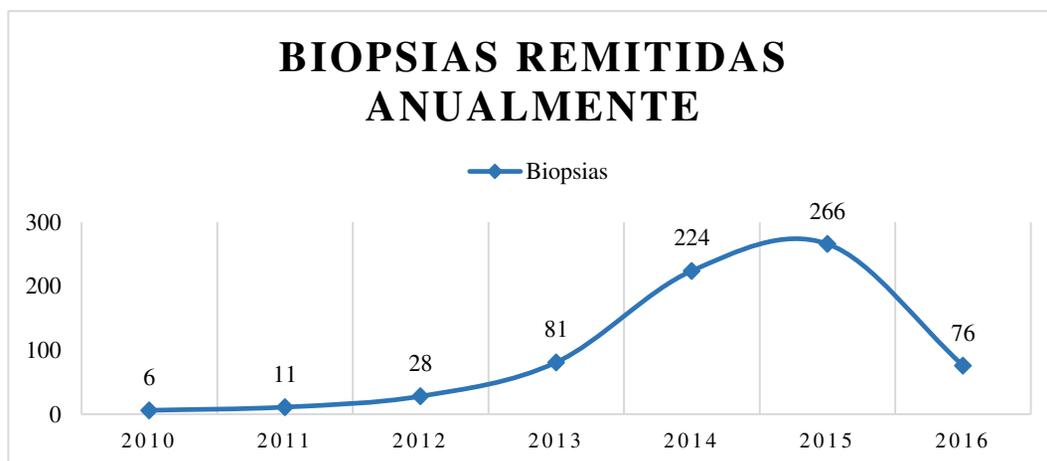


Figura 1. Incremento anual de biopsias remitidas.

Se presenta un incremento exponencial con cada año del 2010 al año 2016. (Del año 2016 solo se incluyen los meses incluidos hasta marzo).

Las biopsias se dividieron en 2 grupos para la realización de estudios de frecuencias, comparación y análisis de datos; Grupo 1, Neoplasias y Grupo 2, No Neoplasias, de los cuales se dividieron 469 (68.2%) y 219 (31.8%) muestras respectivamente, sumando el total de las biopsias de 688.

5.1. Grupo 1, Neoplasias

La neoplasia presente con mayor frecuencia observada fue el carcinoma mamario con 44 casos (9.4%) la cual fue además la neoplasia más frecuente en glándula mamaria (Figura 2), seguida del mastocitoma con 43 casos (9.2%), el cual encabezó las neoplasias de origen tegumentario, ya que fue la más frecuente en este sistema (Figura3), después de estos se colocaron el tumor mixto benigno con 37 casos (7.9%) y el lipoma con 32 casos (6.8%) pertenecientes a glándula mamaria y sistema tegumentario respectivamente. Se observó además la presencia de 2 cordomas (0.4%), una neoplasia muy rara en el perro originaria del mesodermo embrionario (Figura 4).

Se realizó una revisión de la localización de las lesiones de acuerdo a la historia clínica y al sistema en donde se presentaron (Tabla 1). Donde se observó la mayoría de casos dentro del sistema tegumentario y tejidos blandos adyacentes con un total de 251 casos (53.5%), de los cuales 219 (87.4%) pertenecen a piel y 26 (10.5%) en región perianal. Las neoplasias en glándula mamaria se presentaron en segundo lugar con un total de 98 casos (20.9%), dentro del cual el carcinoma mamario con 44 casos (44.9%) fue la neoplasia de mayor frecuencia, seguida por el tumor mixto benigno con 37 casos (35.5). Los órganos reproductivos presentaron un total de 33 casos (7.2%), de los cuales en machos se observaron 21 (63.6%) casos y en hembras 12 casos (36.3%).

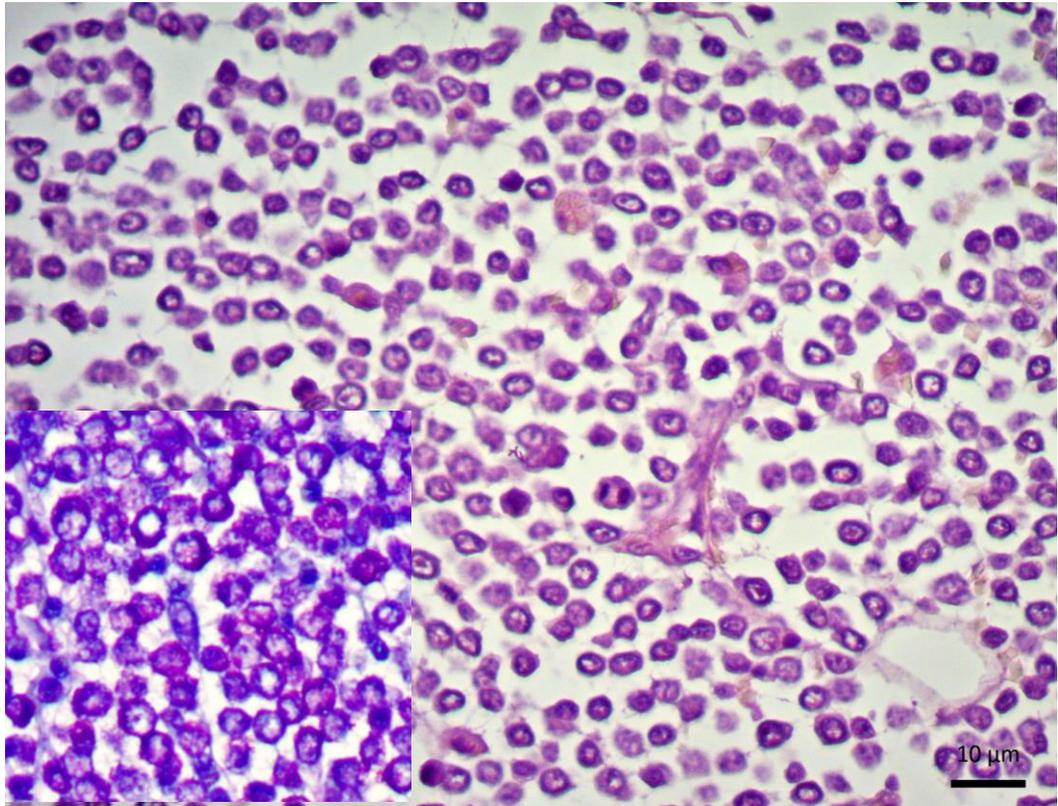


Figura 2. Mastocitoma

Pueden observarse cordones de células redondas mal definidos con escaso citoplasma, se aprecian algunas células en mitosis (H&E 40x, bar 10 μ m.). Recuadro, se observa metacromacia de los gránulos de histamina de los mastocitos, evidenciados con tinción especial (Giemsa 40x, bar 10 μ m.).

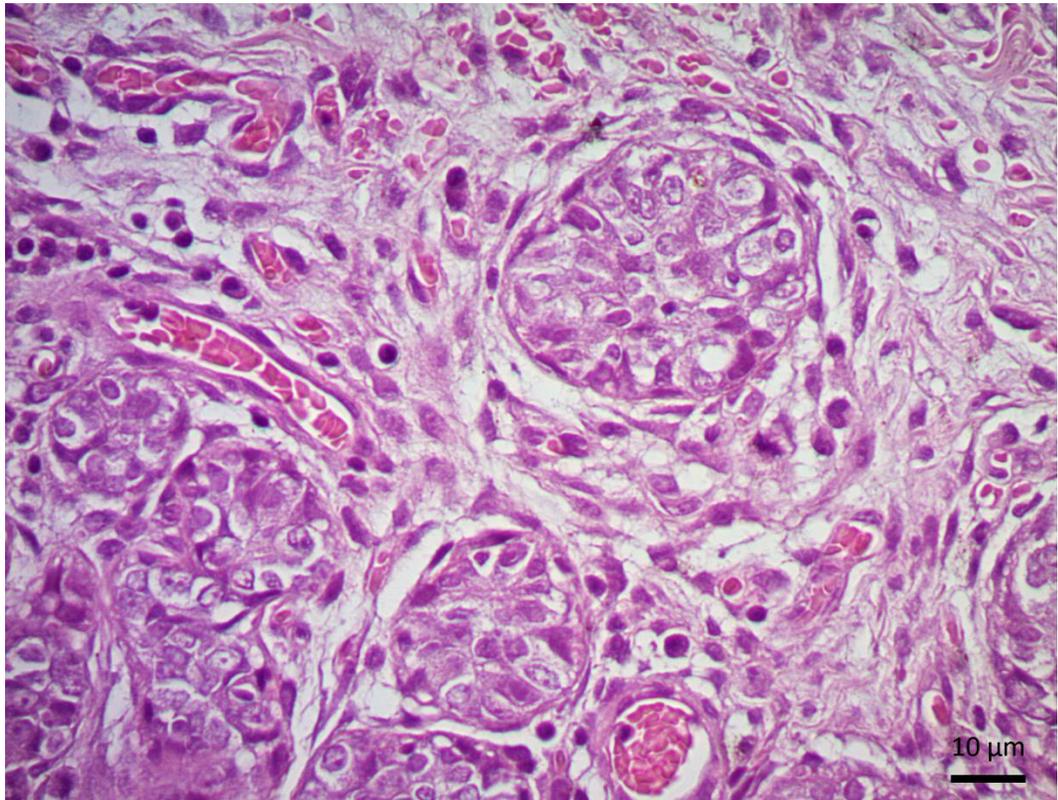


Figura 3. Carcinoma mamario indiferenciado

En la imagen se observan las células del epitelio glandular formando acinos mal definidos, rodeadas de células mioepiteliales con forma fusiforme y algunas presentan citoplasma vacuolado (H&E 40x, bar 10µm.).

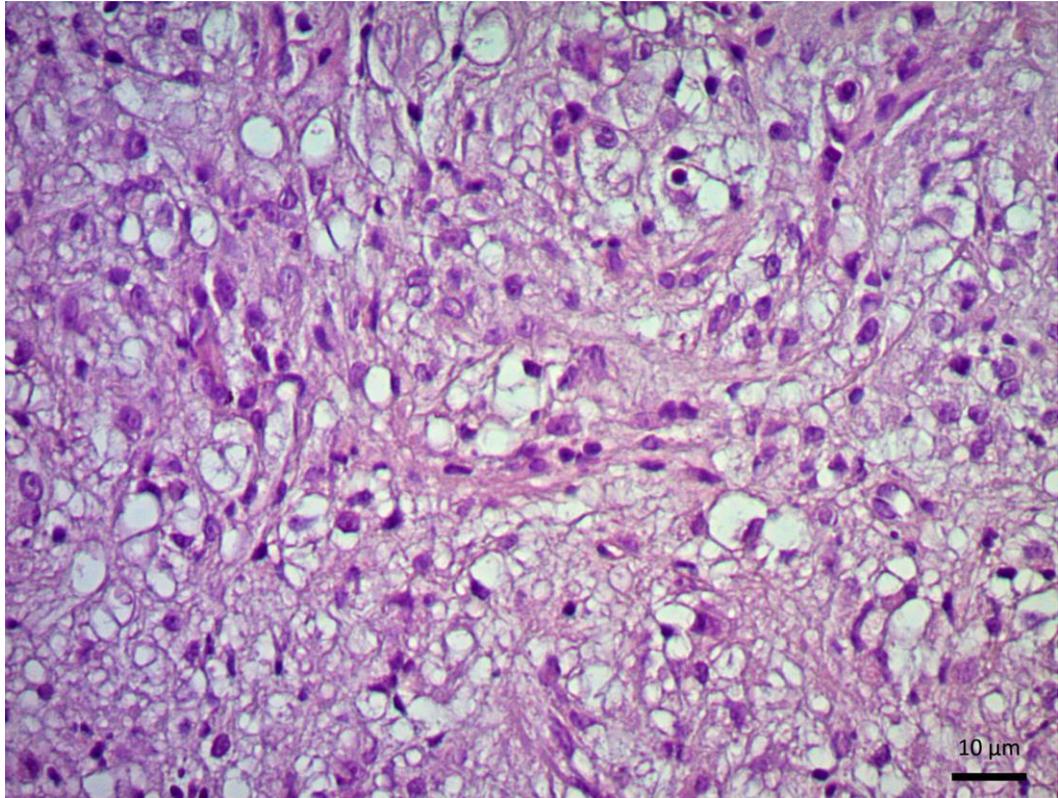


Figura 4. Cordoma

Se aprecian las células vacuoladas (falisíferas), características de esta neoplasia, en patrones completamente desordenados dentro de una matriz mucoide ((H&E 40x, bar 10μm.).

Tabla 1. Localización de las Neoplasias por Sistemas

Localización de las Neoplasias por Sistemas		
	Frecuencias	Porcentajes
Tegumentario y tejidos blandos adyacentes	251	68.2%
A. Piel	219	87.4%
I. Mastocitoma	43	19.6% / 17.1%*
II. Lipoma	32	14.6% / 12.7%*
B. Región perianal	26	10.5%
I. Adenoma de células hepatoideas	8	30.8% / 3.2%*
II. Epitelioma de células hepatoideas	8	30.8% / 3.2%*
Glándula mamaria	98	20.9%
I. Carcinoma mamario	44	44.9%
II. Tumor mixto benigno	37	37.8%
III. Adenoma mamario	16	16.3%
Reproductivo	33	7.0%
A. Macho	21	63.6%
I. Tumor de células de Leydig	7	33.3% / 21.2%*
II. Tumor de células de Sertoli	5	23.8% / 15.2%*
III. Seminoma	5	23.8% / 15.2%*
IV. TVT	4	19.0% / 12.1%*
B. Hembra	12	36.4%
I. Leiomioma	6	50.0% / 18.2%*
II. TVT	4	33.3% / 12.1%*
Digestivo	30	6.4%
A. Cavidad oral	22	73.3%
I. Épulis	12	54.5% / 40.0%*
II. Melanoma maligno	5	22.7% / 16.7%*
B. Hígado	5	16.7%
I. Carcinoma colangiocelular	2	40.0% / 6.7%*
II. Hemangiosarcoma	2	40.0% / 6.7%*
Linfoide	19	4.1%
I. Linfoma	4	73.7%
II. Hemangiosarcoma	2	10.5%
Musculoesquelético	28	6.0%
I. Rabdomiosarcoma	10	34.6%
II. Osteosarcoma	9	32.1%
III. Condroma	3	10.7%
Endócrino	6	1.3%
I. Carcinoma tiroideo	4	66.7%
II. Feocromocitoma	1	16.7%
Urinario	3	0.6%
I. Carcinoma del epitelio de transición	2	66.7%
Ojo	1	0.2%
I. Melanocitoma uveal anterior	1	100%
Total	469	100%

En sombra negra se presentan los porcentajes de los casos del sistema correspondiente y los valores previos (cuando los hay) son los que corresponden al sitio de la biopsia original. En sombra gris, se encuentran subdivisiones en algunos sistemas. *Porcentaje representativo de la subdivisión.

5.2. Grupo 2, No Neoplasias

Este grupo incluye a todos aquellos diagnósticos en los cuales el patólogo determinó que no se trataba de un caso de neoplasia, independientemente si el clínico lo sospechaba o no. Las dermatitis representaron un 26.5% (58 muestras) del total de las muestras (219 muestras), dentro de las dermatitis se englobaron todas las distintas causas y diagnósticos concluyentes en una dermatitis sin especificar área o etiología, por ejemplo, dermatitis supurativa, dermatitis atípica, dermatitis linfocítica, etc. Los casos de mastitis representaron un 5.9% con 13 muestras incluyéndose cualquier causa no neoplásica de mastitis, en cavidad oral se diagnosticaron 9 casos de estomatitis que representa un 4.1% dentro de este grupo y se diagnosticaron 14 casos de micosis (4.6%) dentro de las cuales destacan la coccidioidomicosis con 4 casos (1.8% dentro del grupo de No Neoplasias) con un 28.6% de presencia dentro de las micosis encontradas en las muestras (Figura 5), algunas de las otras micosis no se corroboró el género al que pertenecían, sin embargo, se dieron como positivas al encontrar las estructuras fúngicas o compuestos de ellas.

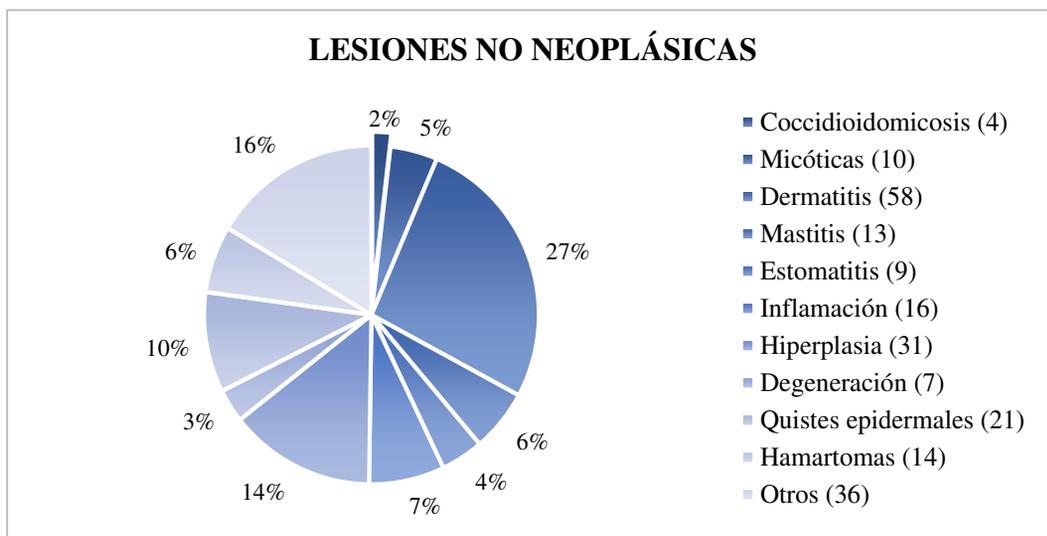


Figura 5. Lesiones No Neoplásicas

Frecuencia de los diferentes tipos de lesiones que resultaron no ser neoplasia.

5.3. Casos de Coccidioidomicosis con Diagnóstico Presuntivo de Neoplasia

Los casos que resultaron positivos a coccidioidomicosis diseminada a partir de biopsias con una sospecha principal de neoplasia procedieron a un diagnóstico más certero, corroborando con tinciones especiales como GMS y PAS para resaltar las estructuras fúngicas en cada caso, lograr una descripción más detallada, completa y específica, así como para establecer un comparativo; posteriormente a las muestras positivas se procedió a realizar extracciones de ADN con su posterior PCR para buscar amplicones correspondientes a cada especie de *Coccidioides* mediante electroforesis.

5.3.1. Caso No. 1

Pastor Alemán macho de 18 meses, lesiones nodulares indoloras de (0.5-1cm) en tarsos, falanges y región lumbar, a la radiografía se muestra tejido óseo afectado con baja densidad y tejido proliferativo que hacen sospechar al médico de neoplasia, el cuál remite las lesiones como biopsias a histopatología.

Diagnóstico presuntivo: Osteosarcoma

Macroscópicamente: Se reciben seis muestras pequeñas (0,3 a 0,5 cm) de tejido se tomaron de las zonas afectadas, se fijaron en formalina buferada al 10% y presentadas a estudio histopatológico.

Microscópicamente: Todas las biopsias mostraron extensa proliferación de tejido conectivo fuertemente infiltrado con macrófagos, células gigantes multinucleadas y algunos neutrófilos y linfocitos. Lo más notable fue la presencia de numerosos esférulas ovals (diámetro 10-40µm) PAS- y GMS-positivas con paredes gruesas refráctiles que contienen cuerpos pequeños (endosporas). La

mayoría de estas esférulas estaban intactas, pero algunos de ellos se rompieron liberando las endosporas en los alrededores (Figura 6). Estas esférulas fueron interpretadas como organismos fúngicos con características morfológicas de *Coccidioides spp.*

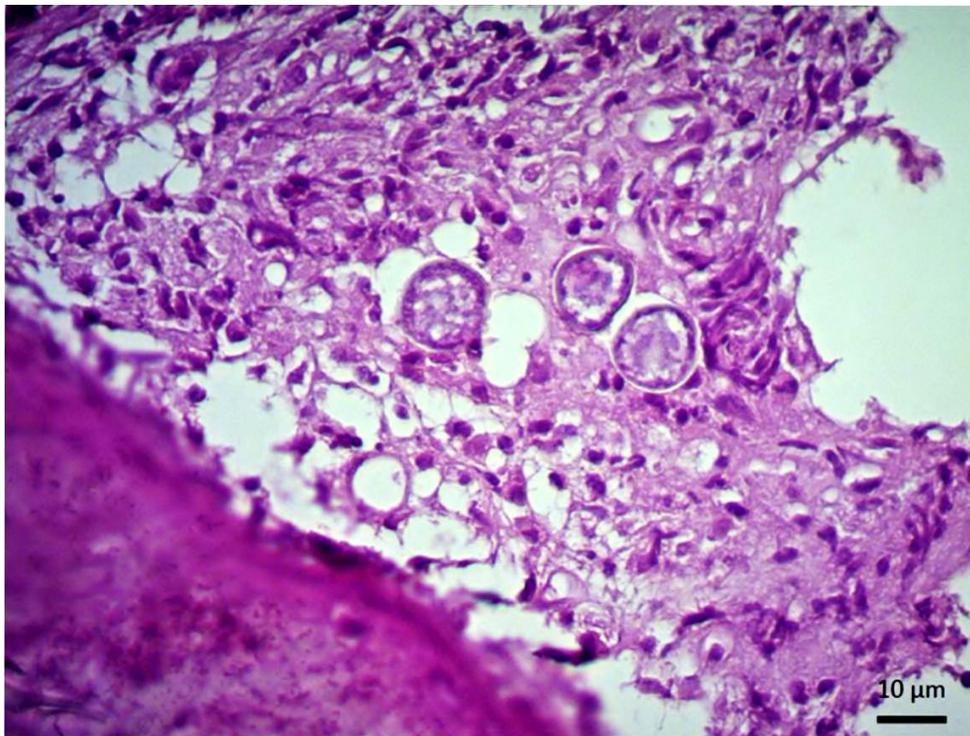


Figura 6. Caso 1, Osteítis granulomatosa por *Coccidioides spp.*

Inflamación granulomatosa con extenso tejido conectivo infiltrado, presencia de estructuras características de un granuloma (macrófagos, células gigantes y neutrófilos). Además estructuras fúngicas esféricas correspondientes con *Coccidioides spp.* (H&E 40x, bar 10 μ m.)

Diagnóstico morfológico: grave periostitis granulomatosa y dermatitis profunda, crónica, localmente extensiva con numerosas intralesional, organismos fúngicos consistentes con *Coccidioides spp.*

5.3.2. Caso2

Boxer hembra de 12 meses, presentaba una inflamación progresiva en la extremidad posterior izquierda en la región poplítea, la cual al examen clínico presentaba movilidad y era indolora, el médico interpretó la masa como un nódulo linfático hipertrofiado, realizó escisión quirúrgica completa, el cual al incidir presentaba una textura suave con hemorragias en la superficie de corte.

Diagnóstico presuntivo: Linfoma

Macroscópicamente: El nódulo linfático se fijó en formalina buferada al 10% y presentado para su examen histopatológico.

Microscópicamente: El espécimen era un nódulo linfático, la arquitectura histológica se encontraba notablemente distorsionada por fibrosis y una infiltración intensa de los macrófagos, células gigantes multinucleadas, linfocitos, células plasmáticas y neutrófilos. La respuesta inflamatoria fue más evidente en el hilio del linfonodo donde se presentó una fibroplasia marcada. Embebidas en esta reacción granulomatosa se observaron numerosas esférulas PAS/GMS-positivos que variaban en tamaño desde 10 a 40 μ m de diámetro. Estas estructuras fúngicas tenían gruesas paredes birrefringentes contenían endosporas redondas (Figura 7).

Diagnóstico morfológico: Linfadenitis granulomatosa/piogranulomatosa, grave crónica multifocal coalescente con numerosos organismos fúngicos intralesionales consistentes con *Coccidioides spp.*

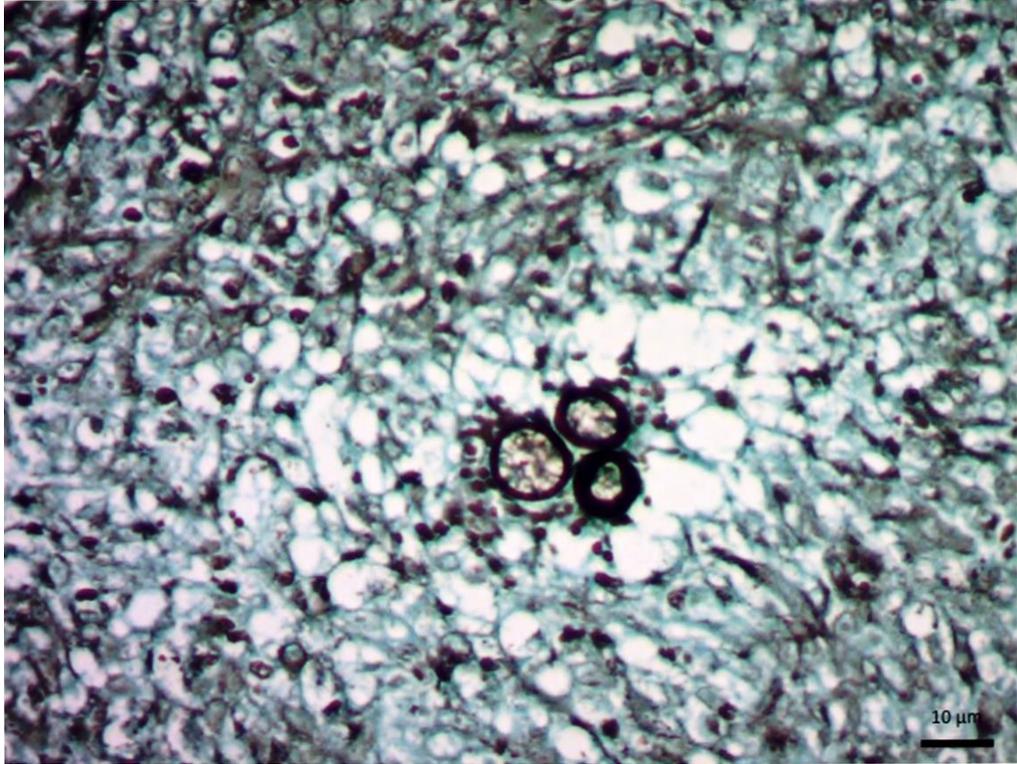


Figura 7. Caso 2, Linfadenitis piogranulomatosa por *Coccidioides spp.*

La tinción especial muestra tres organismos en una reacción piogranulomatosa (GMS 40x, bar 10μm.).

5.3.3. Caso 3

Labrador retriever hembra adulto de edad desconocida, presentó debilidad progresiva desde meses atrás, ataxia y postración según la historia clínica, además presentaba una masa no ulcerada (7.0 x 6.0cm) en la superficie izquierda del tórax entre las costillas 9 y 11, la cual no era móvil ni presentaba dolor al tacto. El estudio radiográfico expuesto localmente mostró extensa osteólisis de costillas afectadas. La masa se eliminó parcialmente y se presentó para su examen histopatológico.

Diagnóstico presuntivo: Neurofibroma.

Microscópicamente: La muestra fue compuesta por la piel y tejido subcutáneo con infiltrado severo y difuso de macrófagos, linfocitos, células plasmáticas, células gigantes multinucleadas y pocos neutrófilos. Estos infiltrados inflamatorios estaban formando así granulomas bien delimitados con centros necróticos rodeados por células fagocíticas y rodeado con una banda delgada de tejido conectivo fibroso. Estas lesiones granulomatosas también contenían numerosas estructuras fúngicas PAS/GMS-positivas morfológicamente consistentes con *Coccidioides spp.* (Figura 8).

Diagnóstico morfológico: dermatitis granulomatosa severa profunda, fascitis y periostitis (costillas 9-11), localmente extensa, con numerosas estructuras fúngicas intralesionales compatibles *Coccidioides spp.*

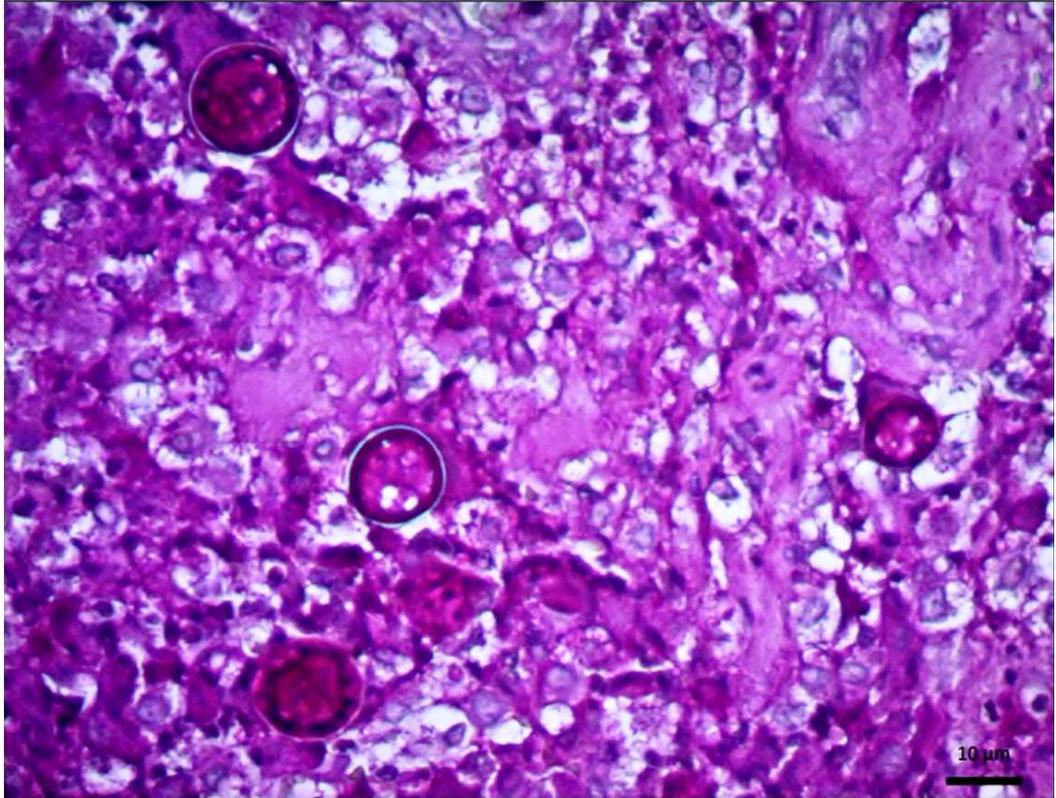


Figura 8. Caso 3, Dermatitis y periostitis granulomatosa severa por *Coccidioides spp.*
Se observan varias esférulas con pared celular gruesa y refringente, evidenciadas con tinción especial. Las endosporas contenida dentro están mal definidas. La reacción inflamatoria es compuesta por los macrófagos epitelioides y linfocitos; la proliferación de tejido conectivo fibroso es prominente (PAS 40x, bar 10 μ m.)

5.3.4. Caso 4

Bull terrier hembra de 3 años de edad, presentó anorexia, pérdida de peso y vómito crónico, se realizó laparotomía exploratoria en la cual se aprecian diversos nódulos multifocales diseminados en peritoneo, hígado y bazo.

Diagnóstico presuntivo: Metástasis a causa de neoplasia primaria.

Macroscópicamente: Se recibieron frascos identificados como hígado, bazo, peritoneo y peritoneo saco. Los cuales se identificaron con números 1 (1.1 y 1.2), 2 y 3. Las muestras se utilizaron por completo para sus procesos histopatológicos de rutina y después se tiñeron con H&E.

Microscópicamente:

1.1. Bazo. Se aprecia una gruesa capsula de tejido conectivo fibroso adherida y otra estructura fibrosa parcialmente adherida. Ambas presentan una proliferación de tejido conectivo fibroso y tejido de granulación ya denso con neovascularización. Además, con algunas células inflamatorias (neutrófilos) esparcidas o formando pequeños conglomerados, inclusive formando piogranulomas. El parénquima muestra extensas hemorragias.

1.2. Hígado. Lesiones similares a las del bazo con infiltración inflamatoria dispersa de neutrófilos, linfocitos y macrófagos y formando eventualmente conglomerados que muestran macrófagos activos y en el centro neutrófilos necróticos (piogranulomas). La lesión muestra proyecciones necróticas y de fibrina organizada en algunas partes. En parénquima hay congestión centrolobulillar y zonas de hemorragia con macrófagos activos con hemosiderina en su interior.

2. **Peritoneo.** Gran cantidad de fibrina organizada con extensas hemorragias y zonas de necrosis. La infiltración inflamatoria es similar a las descripciones en hígado y bazo; sin embargo, aquí hay numerosos piogranulomas bien definidos. Eventualmente en el centro de los piogranulomas o de manera aledaña hay estructuras micóticas caracterizadas por grandes esférulas, algunas con endosporas definidas y otras con parcial definición en su interior (Figura 9). La pared es doble birrefringente y no hay gemación. Algunas de estas estructuras micóticas se encuentran intactas y otras fragmentadas. Su tamaño es grande pero variable entre 10 a 20 μm y otras aún mayores entre 40 y 60 μm .

3. **Peritoneo saco.** La lesión es semejante pero aquí con una marcada fibroplasia y neovascularización. La presencia de piogranulomas con estructuras micóticas es aún más evidente.

Diagnóstico Morfológico: Peritonitis micótica granulomatosa crónica severa, las estructuras fúngicas intralesionales son compatibles con *Coccidioides spp.*

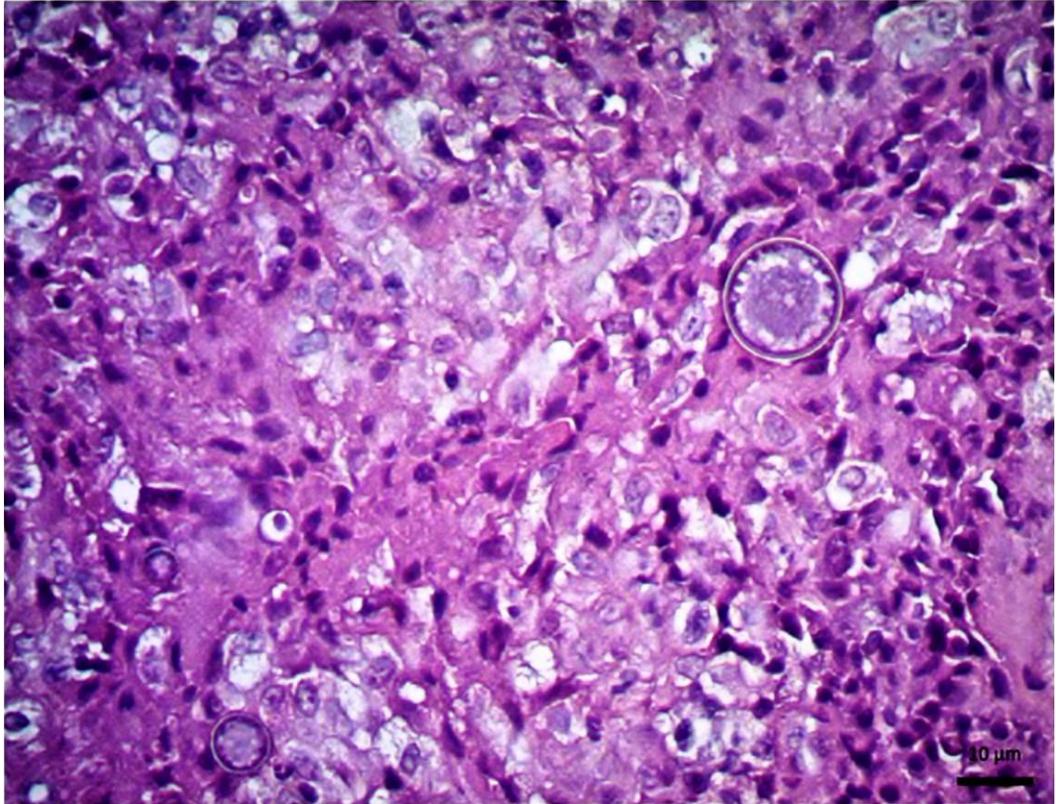


Figura 9. Caso 4, Peritonitis granulomatosa crónica severa por *Coccidioides spp.*

Se aprecia inflamación granulomatosa característica con excesiva presencia de macrófagos y linfocitos rodeando las estructuras fúngicas de pared gruesa concordante con *Coccidioides spp.* Imagen representativa de todos los casos incluidos (H&E 40x, bar 10μm.).

5.4. Análisis Molecular

Las muestras positivas a coccidioidomicosis diseminada por medio de histopatología, fueron sometidas a ensayos de PCR punto final, para determinar la especie (*C. immitis* o *C. posadasii*) involucrada en sus respectivos casos. Lamentablemente la muestra del caso 1 fue utilizada por completo para el proceso histopatológico, quedando sin material para el proceso molecular, las muestras del caso 2, 3 y 4 fueron sometidas a desparafinación y posterior extracción de ADN mediante el kit antes mencionado, de los cuales la muestra del caso 2 no se obtuvo suficiente material genético para su amplificación, debido a una baja concentración ADN obtenida de la extracción, obteniendo un resultado negativo en la electroforesis (Carril 1), incluso la muestra se usó en su totalidad para obtener mejores resultados sin observar mejoría notable, la muestra del caso 3, fue determinada exitosamente, dando como resultado una amplificación de 634 pb (Carril 2), lo que corresponde con *C. posadasii* (Figura 10).

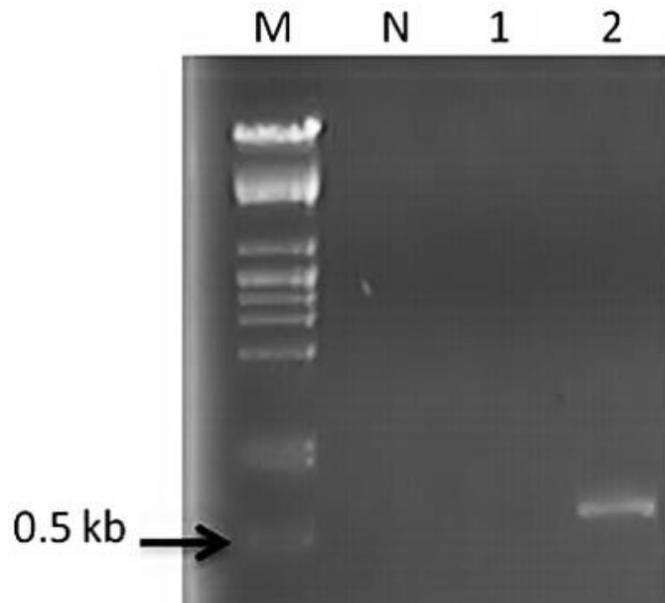


Figura 10. Amplificación de PCR punto final, *C. posadasii*
Electroforesis en gel de agarosa de muestras 2 y 3 (M) Marcador de peso molecular; (N) control negativo; (1) muestra de caso 2; (2) muestra de caso 3 con un amplicón de 634 pb. Resultado correspondiente con *C. posadasii*.

Las diferentes muestras del caso 4 fueron sometidas a extracción de ADN mediante el mismo kit de extracción, siguiendo el mismo protocolo y se logró obtener muy buenas concentraciones de ADN, sin embargo, el material genético extraído fue de mala calidad o fue muy escaso el genoma presente por parte del hongo, se corroboró la correcta extracción, la realización de la PCR y la corrida de la electroforesis en gel de agarosa utilizando diversos controles positivos como: amplicones confirmados positivos, primers dirigidos hacia el genoma del hospedero y de secuencias más cortas e incluso se corrió la electroforesis añadiendo ADNg en un carril para corroborar la integridad de la muestra.

Se corrieron 4 muestras con diferentes concentraciones de ADN y distintas concentraciones en reactivos para PCR (carriles 2-5), 2 muestras para buscar Gliceraldehido 3-Fosfato Deshidrogenasa (GAPDH), la cual debe amplificar fragmentos del genoma del hospedero y más cortos que el buscado para el hongo (carriles 6 y 7) y ADNg (carril 8), resultando positiva una muestra a GAPDH de 114pb (carril 7) y un barrido en la muestra de ADNg (carril 8), confirmando

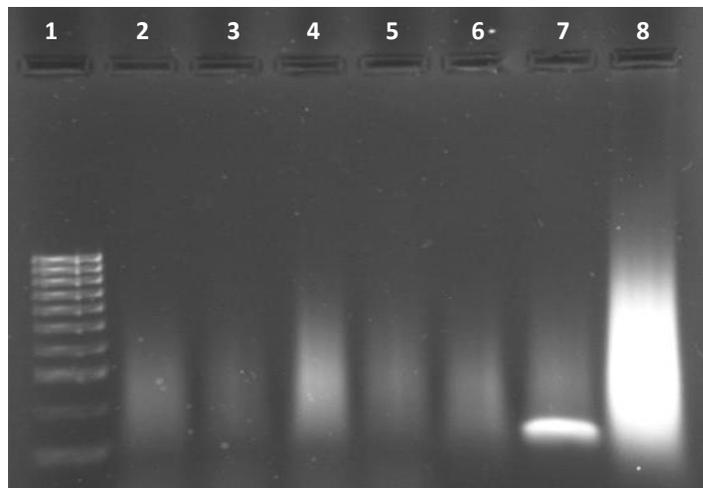


Figura 11. Electroforesis en Gel de Agarosa, muestra 4.

Se aprecia claramente un barrido del material genético, indicativo de fragmentación del ADN, el cual dificulta la amplificación de fragmentos mayores a 200pb, se observa amplicón de GAPDH 114pb utilizado como control positivo a la PCR.

sospechas de escaso ADN micótico, o fragmentación del mismo, marcador de peso molecular de 100kb (carril 1) (Figura 11).

5.5. Análisis Estadístico

Se elaboró una tabla de contingencia 2x2 (Tabla 2) sobre la opinión entre el clínico y el patólogo en cada muestra con la cual se determinó la relación entre ambas opiniones mediante una prueba de χ^2 (Tabla 3), la cual indicó que existe diferencia de opinión entre ambos ($p < 0.0001$), que era de esperarse, por la diversidad de lesiones que pudieran llegar a confundirse con neoplasias y posteriormente una prueba de κ para determinar la concordancia entre ambos diagnósticos (Tabla 4), señalando que existe una concordancia regular ($\kappa = 0.458$) ya que es normal que exista cierta discrepancia sobre el diagnóstico.

Tabla 2. Tabla de contingencia 2x2, opinión del diagnóstico clínico/patólogo.

	C+	C-	Σ (P)
P+	461 67.0%	8 1.2%	469 68.2%
P-	124 18.0%	95 13.8%	219 31.8%
Σ (C)	585 85.0%	103 15.0%	688 100.0%

En cada recuadro se muestran el total de muestras y debajo de este, un porcentaje representativo del total de muestras.

C= opinión del clínico con respecto al diagnóstico, positivo (+) y negativo (-)

P= opinión del patólogo con respecto al diagnóstico, positivo (+) y negativo (-)

Σ = sumatoria de...

Tabla 3. Chi-cuadrada de Pearson, Relación de opiniones clínico/patólogo.

	Valor	gl	p
Chi-cuadrado	203.67	1	0.0001*
N	688		

gl= grados de libertad

p= valor de significancia

N= número de muestras

*(p<0.0001) asociación entre filas e hileras es extremada mente significativa.

Tabla 4. Kappa de Cohen, Correlación del diagnóstico clínico/patólogo

	Valor
Kappa de Cohen	.458*
N	688

N= número de muestras

*($\kappa = .458$) correlación regular entre ambos diagnósticos.

6. DISCUSIÓN

La coccidioidomicosis es una enfermedad que afecta tanto a perros como a humanos, y no se le toma la importancia que debería, puesto que en escasas ocasiones se incluye dentro del diagnóstico presuntivo a pesar de que representa una identidad de importancia por verse enmascarada con lesiones inflamatorias, granulomatosas e incluso neoplásicas en los diferentes sistemas corporales (Ramírez-Romero *et al.*, 1991; Oldfield *et al.*, 1995; Shubitz and Dial, 2005; Ajithdoss *et al.*, 2011; Malo *et al.*, 2014).

En definitiva, cuando el clínico se encuentre con casos de lesiones neoplásico-inflamatorias, es la histopatología, irrefutablemente, la herramienta más eficiente para lograr una mejor aproximación al problema origen, sin importar la naturaleza de la que se trate (Caraway *et al.*, 2003; Rosai, 2007; Guarner and Brandt, 2011).

Existen reportes anteriores de coccidioidomicosis enmascarada con ciertos tipos de neoplasia, en los cuales ni siquiera se llegó a la sospecha de esta enfermedad, es de suma importancia sospechar de *Coccidioides spp.* como agente causal de algunos tipos de lesiones neoplásico-inflamatorias, sobre todo si se presentan casos de enfermedad debilitante crónica, fiebres recurrentes, episodios de tos prolongados, linfadenopatía, claudicación y nódulos o úlceras cutáneas que han sido tratadas y no sanan. Otro factor importante a tomar en cuenta es la sospecha en animales que han viajado o que viven en zonas endémicas de coccidioidomicosis (Ramírez-Romero *et al.*, 1991; Shubitz and Dial, 2005; Graupmann-Kuzma *et al.*, 2008; Ajithdoss *et al.*, 2011).

Es importante señalar que las neoplasias y la coccidioidomicosis a pesar de ser padecimientos completamente distintos y no presentar relación entre sí, pudieran presentarse en conjunto. Jeroski (2003), reporta un caso de esta

comorbilidad, donde un perro fue sometido a un tratamiento antimicótico por osteomielitis coccidioidal, y al presentar lindafenitis periférica generalizada se procedió a tomar muestra, diagnosticando un caso en conjunto de linfosarcoma y linfadenitis coccidioidal, cabe señalar que un tratamiento de quimioterapia y antimicóticos dio muy buenos resultados.

La coccidioidomicosis en humanos es altamente prevalente en el norte de México, en especial en zonas colindantes con EE.UU. Algunos estudios epidemiológicos realizados entre 1994 y 2005 para determinar la prevalencia de *Coccidioides spp.* mediante diagnóstico serológico utilizando la prueba intradérmica mostró rangos desde 9.2% en Tijuana, Baja California hasta 93% en Matamoros, Coahuila y señalando una prevalencia media nacional de 1.6% en la república mexicana. Así mismo, la prevalencia en el norte de México es comparable con la encontrada en el sur de EE.UU. (Baptista and Riquelme, 2007; Hector *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2013).

En las lesiones granulomatosas provocadas por *Coccidioides spp.* se ha encontrado a los linfocitos T con gran predominancia, sin embargo, la reacción inflamatoria que produce no es nada específica ni comparable, incluso comparte características histológicas con otro tipo de infecciones fúngicas y algunas ocasionadas por algas, como paracoccidioidosis, blastomicosis, protothecosis, chlorelisis, las cuales ocurren de forma natural en el perro (Quigley *et al.*, 2009; de Farias *et al.*, 2011; Shubitz *et al.*, 2011; Parker *et al.*, 2013; Vince *et al.*, 2014).

En medicina, la patología ha sido considerada la piedra angular en el diagnóstico de las enfermedades neoplásicas, en medicina veterinaria también lo es (Rosai, 2007). Además, la patología no solo permite orientar el diagnóstico clínico y la terapia cuando, en lugar de neoplasia, sino que también ha sido señalada como la prueba de oro cuando se trata de una lesión granulomatosa como en el caso de

Coccidioides spp., (Caraway *et al.*, 2003). En este trabajo se confirma la eficiencia del diagnóstico clínico de los médicos veterinarios porque de 585 biopsias sospechosas de neoplasia, solamente en cuatro (0.7%) de ellas se reconoció *Coccidioides*; no obstante debe tenerse en cuenta que las lesiones causadas por este hongo pueden hacer sospechar de neoplasia.

La confirmación del diagnóstico molecular se obtuvo sólo en uno de los casos (muestra 3), la cual resultó positivo a *Coccidioides posadasii*, es probable que las otras muestras estuvieran dañadas debido al tiempo de almacenado, al proceso de inclusión el xileno, el someterse a diversas temperaturas, incluso dentro del proceso de extracción puede existir daño por los métodos empleados y obtener un ADN de mala calidad ya sea por contaminación o por fragmentación (Sengüven *et al.*, 2014), la histopatología es suficiente y concluyente en el diagnóstico de la coccidioidomicosis (Caraway *et al.*, 2003), sin embargo, en este trabajo se quiso profundizar un poco más y obtener la especie específica, no obteniendo los resultados esperados. En adición, *C. posadasii* ha sido encontrado en el sureste EE.UU., en Texas y noreste de México, en Nuevo León, en donde ambos estados han sido reportados altamente endémicos con presencia de esta especie (Lopes-Colombo *et al.*, 2011), por lo que se sospecha que todos los casos pudieran ser positivos a la misma especie de *Coccidioides*.

7. CONCLUSIÓN

Este estudio señala la presencia activa de *Coccidioides spp.* dentro del área metropolitana de Monterrey, el cual se ha presentado en casos aislados, sin embargo, es nulo el estudio que se realiza sobre este patógeno y debe de considerarse su estudio epidemiológico constante debido a que nos encontramos en un área que ha sido señalada como altamente endémica con anterioridad.

El perro es sin lugar a duda un excelente modelo de estudio sobre distintas enfermedades que afectan al humano, puesto que presentan cuadros muy similares, e incluso la patogenia y terapéutica han sido comparadas frecuentemente, desde el desarrollo de neoplasias en los distintos sistemas, como enfermedades micóticas como la coccidioidomicosis.

Es necesario comenzar a emplear métodos de vigilancia para la coccidioidomicosis, independientemente del método utilizado para su vigilancia epidemiológica, la coccidioidomicosis debe comenzar a formar parte dentro del cuadro de infecciones micóticas sistémicas comunes, tanto en el perro como en el humano, para ello, el perro es un aliado importante en la distribución de esta enfermedad, puesto que es un excelente centinela para la detección de esta enfermedad en áreas sospechosas.

Las neoplasias reconocidas en este estudio confirman que el perro es también un excelente modelo para el estudio de la presentación espontánea de neoplasias; la mayoría con equivalencia en importancia y semejanza clinicopatológica con lo que acontece en el hombre.

Es importante señalar que a pesar de no haber obtenido los resultados deseados mediante patología molecular, el diagnóstico de la coccidioidomicosis no

es concluyente mediante la PCR, por lo que este método no es la mejor opción como herramienta principal para el diagnóstico en este caso, antes deben implementarse otros métodos más eficientes para la detección del agente, en contraste, la histopatología es y será siempre el mejor método diagnóstico en casos similares donde la coccidioidomicosis se asemeja a una neoplasia, en este trabajo se encontraron 4 casos positivos (0.7%) enmascarados en 585 biopsias con sospecha de neoplasia, ya que una simple esférula puede generar una gran lesión granulomatosa y un gran daño al tejido, no obstante una simple esfera no siempre es suficiente para obtener resultados positivos en la PCR, ya que el material genético pudiera estar dañado, contaminado, o simplemente ser escaso en la muestra tomada o inclusive estar diluido entre el tejido del hospedero.

Es común la confusión entre el diagnóstico de la coccidioidomicosis y las neoplasias, por las lesiones granulomatosas tan severas que se pueden llegar a presentar, sin embargo el diagnóstico entre los clínicos con respecto a las biopsias fue adecuado en más de un 80%, lo que indica una buena aproximación diagnóstica por su parte

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ajithdoss, D.K., Trainor, K.E., Snyder, K.D., Bridges, C.H., Langohr, I.M., Kiupel, M., Porter, B.F., 2011. Coccidioidomycosis presenting as a heart base mass in two dogs. *J Comp Pathol* 145, 132-137.
2. Arora, N.P., Taneja, V., ReyesSacín, C., Bhanot, R., Natesan, S.K., 2012. Coccidioidomycosis masquerading as malignancy. *BMJ Case Rep* 2012.
3. Aviles-Salas, A., 2007. Coccidioidomycosis extrapulmonar: Presentación de un caso y revisión de la literatura, *Rev. chil. infectol.*, Sociedad Chilena de Infectología, pp. 398-401.
4. Baptista, R.R., Riquelme, M., 2007. Epidemiología de la coccidioidomycosis en México. *Rev Iberoam Micol* 24, 100-105.
5. Bentley, R.T., Heng, H.G., Thompson, C., Lee, C.S., Kroll, R.A., Roy, M.E., Marini, L., Heo, J., Wigle, W.L., 2015. Magnetic Resonance Imaging Features and Outcome for Solitary Central Nervous System Coccidioides Granulomas in 11 Dogs and Cats. *Vet Radiol Ultrasound* 56, 520-530.
6. Brown, J., Benedict, K., Park, B.J., Thompson, G.R., 3rd, 2013. Coccidioidomycosis: epidemiology. *Clin Epidemiol* 5, 185-197.
7. Cannella, A.P., Vinetz, J.M., 2014. A Young Man Evaluated for Suspicion of Lymphoma. *Am J Trop Med Hyg* 91, 440-441.
8. Caraway, N.P., Fanning, C.V., Stewart, J.M., Tarrand, J.J., Weber, K.L., 2003. Coccidioidomycosis osteomyelitis masquerading as a bone tumor. A report of 2 cases. *Acta Cytol* 47, 777-782.
9. Carpenter, J.B., Feldman, J.S., Leyva, W.H., DiCaudo, D.J., 2010. Clinical and pathologic characteristics of disseminated cutaneous coccidioidomycosis, *J Am Acad Dermatol*, 2008 American Academy of Dermatology, Inc. Published by Mosby, Inc, United States, pp. 831-837.
10. Carpio-Alemán, F., Ortiz-Calle, K.A., Quito-Saldaña, M.A., 2013. Estudio histopatológico (biopsias) de masas cutáneas en caninos de las clínicas

veterinarias de la Ciudad de Cuenca, Patología Veterinaria, Universidad de la Cuenca, Cuenca, Ecuador, p. 156.

11. Chen, C.-M., Lee, H.-E., Li, S.-Y., 2010. Coccidioidomycosis with cutaneous manifestation of erythema nodosum in Taiwan. *Dermatologica Sinica* 28, 154-158.
12. Crum, N.F., 2005. Disseminated coccidioidomycosis with cutaneous lesions clinically mimicking mycosis fungoides. *Int J Dermatol* 44, 958-960.
13. de Farias, M.R., Condas, L.A., Ribeiro, M.G., Bosco Sde, M., Muro, M.D., Werner, J., Theodoro, R.C., Bagagli, E., Marques, S.A., Franco, M., 2011. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. *Mycopathologia* 172, 147-152.
14. de Vivero, L., Chavera, A., Perales, R., Fernández, V., 2013. Frecuencia de neoplasias caninas en Lima: estudio retrospectivo en el periodo 1995-2006. *Rev. investig. vet. Perú* 24, 182-188.
15. Dennis, M.M., McSparran, K.D., Bacon, N.J., Schulman, F.Y., Foster, R.A., Powers, B.E., 2011. Prognostic Factors for Cutaneous and Subcutaneous Soft Tissue Sarcomas in Dogs.
16. Deus, F.A., 2009. Chapter 2: coccidioidomycosis, *J Bras Pneumol*, pp. 920-930.
17. Dobson, J.M., 2013. Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. *ISRN Vet Sci* 2013, 941275.
18. Dobson, J.M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K., Wood, J.L., 2002. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract* 43, 240-246.
19. Eleni, C., Scholl, F., Scaramozzino, P., 2014. Causes of death in dogs in the province of Rome (Italy). *Vet Ital* 50, 137-143.
20. Ellis, M.W., Dooley, D.P., Sundborg, M.J., Joiner, L.L., Kost, E.R., 2004. Coccidioidomycosis mimicking ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 104, 1177-1179.

21. Eyer, B.A., Qayyum, A., Westphalen, A.C., Yeh, B.M., Joe, B.N., Coakley, F.V., 2004. Peritoneal coccidioidomycosis: a potential CT mimic of peritoneal malignancy. *Abdom Imaging* 29, 505-506.
22. Gaidici, A., Saubolle, M.A., 2009. Transmission of coccidioidomycosis to a human via a cat bite. *J Clin Microbiol* 47, 505-506.
23. Galgiani, J.N., 1993. Coccidioidomycosis, *West J Med*, pp. 153-171.
24. Garcia-Garcia, S.C., Salas-Alanis, J.C., Flores, M.G., Gonzalez-Gonzalez, S.E., Vera-Cabrera, L., Ocampo-Candiani, J., 2015. Coccidioidomycosis and the skin: a comprehensive review. *An Bras Dermatol* 90, 610-619.
25. Gautam, R., Srinath, I., Clavijo, A., Szonyi, B., Bani-Yaghoub, M., Park, S., Ivanek, R., 2013. Identifying areas of high risk of human exposure to coccidioidomycosis in Texas using serology data from dogs. *Zoonoses Public Health* 60, 174-181.
26. Graupmann-Kuzma, A., Valentine, B.A., Shubitz, L.F., Dial, S.M., Watrous, B., Tornquist, S.J., 2008. Coccidioidomycosis in dogs and cats: a review. *J Am Anim Hosp Assoc* 44, 226-235.
27. Guarner, J., Brandt, M.E., 2011. Histopathologic Diagnosis of Fungal Infections in the 21st Century, *Clin Microbiol Rev*, pp. 247-280.
28. Guimaraes, M.D., Marchiori, E., Meirelles, G.S., Hochhegger, B., Santana, P.R., Gross, J.L., Bitencourt, A.G., Boonsirikamchai, P., Godoy, M.C., 2013. Fungal infection mimicking pulmonary malignancy: clinical and radiological characteristics. *Lung* 191, 655-662.
29. Halsey, E.S., Rasnake, M.S., Hospenthal, D.R., 2005. Coccidioidomycosis of the male reproductive tract. *Mycopathologia* 159, 199-204.
30. Hector, R.F., Rutherford, G.W., Tsang, C.A., Erhart, L.M., McCotter, O., Anderson, S.M., Komatsu, K., Tabnak, F., Vugia, D.J., Yang, Y., Galgiani, J.N., 2011. The Public Health Impact of Coccidioidomycosis in Arizona and California. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8, 1150-1173.
31. Hirschmann, J.V., 2007. The early history of coccidioidomycosis: 1892-1945. *Clin Infect Dis* 44, 1202-1207.

32. Huang, J.I., Seeger, L.L., Jones, N.F., 2000. Coccidioidomycosis fungal infection in the hand mimicking a metacarpal enchondroma. *J Hand Surg Br* 25, 475-477.
33. Ildefonso-Cruz, R., 1997. Clasificación histológica según la Organización Mundial de la Salud y frecuencia de neoplasias en animales domésticos, aves y peces, durante el periodo 1967 - 1995 en Valdivia, Chile, Instituto de Patología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile, p. 130.
34. J. Withrow, S., M. Vail, D., 2007. *Small Animal Clinical Oncology*. 4th Edition ed. ELSEVIER, Canada.
35. Jeroski, A., 2003. Multicentric lymphoma and disseminated coccidioidomycosis in a dog, *Can Vet J*, pp. 62-64.
36. Johnson, L., Gaab, E.M., Sanchez, J., Bui, P.Q., Nobile, C.J., Hoyer, K.K., Peterson, M.W., Ojcius, D.M., 2014. Valley fever: danger lurking in a dust cloud. *Microbes Infect* 16, 591-600.
37. Kelsey, J.L., Moore, A.S., Glickman, L.T., 1998. Epidemiologic studies of risk factors for cancer in pet dogs. *Epidemiol Rev* 20, 204-217.
38. Komotar, J., Clatterbuck, R., 2003. Coccidioidomycosis of the brain, mimicking en plaque meningioma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74, 806.
39. Larizza, L., Mortini, P., Riva, P., 2005. Update on the Cytogenetics and Molecular Genetics of Chordoma, *Hered Cancer Clin Pract*, pp. 29-41.
40. Li, Y.C., Calvert, G., Hanrahan, C.J., Jones, K.B., Randall, R.L., 2014. Coccidiomycosis infection of the patella mimicking a neoplasm - two case reports. *BMC Med Imaging* 14, 8.
41. Llop-Hernández, A., Valdés-Dapena, M., Zuazo-Silva, J., 2001. *Microbiología y Parasitología Médicas, Alina Llop (TOMO I,II,II) - Intercambios Virtuales*. Editorial Ciencias Médicas, La Habana, Cuba.
42. Lopes-Colombo, A., Tobon, A., Restrepo, A., Queiroz-Telles, F., Nucci, M., 2011. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol* 49, 785-798.

43. Malo, J., Luraschi-Monjagatta, C., Wolk, D.M., Thompson, R., Hage, C.A., Knox, K.S., 2014. Update on the diagnosis of pulmonary coccidioidomycosis. *Ann Am Thorac Soc* 11, 243-253.
44. Mendonça-Bellei, M., Silva-Neves, D., Gava, A., Padilha, P., Pilati, C., 2006. Prevalência de neoplasias cutâneas diagnosticadas em caninos no estado de Santa Catarina, Brasil, no período entre 1998 a 2002. *Revista de Ciências Agroveterinarias* 5, 73-79.
45. Meuten, D.J., 2002. *Tumors in domestic animals*. 4. ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
46. Mitchell, M., Dizon, D., Libke, R., Peterson, M., Slater, D., Dhillon, A., 2015. Development of a real-time PCR Assay for identification of *Coccidioides immitis* by use of the BD Max system. *J Clin Microbiol* 53, 926-929.
47. Negroni, R., 2008. Evolución de los conocimientos sobre aspectos clínico-epidemiológicos de la *Coccidioidomycosis* en las Américas. *Rev. argent. microbiol.* 40, 246-256.
48. Oldfield, E.C.I., Olson, P.E., Bone, W.D., Bradshaw, D.A., Martin, C.R., 1995. *Coccidioidomycosis Presenting as Neoplasia: Another Great Imitator Disease*. *Infectious Diseases in Clinical Practice* 4, 87-92.
49. Parker, K., Snead, E., Anthony, J., Silver, T., 2013. Oronasal blastomycosis in a golden retriever. *Can Vet J* 54, 748-752.
50. Petrini, B., Skold, C.M., Bronner, U., Elmberger, G., 2003. *Coccidioidomycosis mimicking lung cancer*. *Respiration* 70, 651-654.
51. Polesky, A., Kirsch, C.M., Snyder, L.S., LoBue, P., Kagawa, F.T., Dykstra, B.J., Wehner, J.H., Catanzaro, A., Ampel, N.M., Stevens, D.A., 1999. *Airway coccidioidomycosis--report of cases and review*. *Clin Infect Dis* 28, 1273-1280.
52. Posadas, A., 1892. Un nuevo caso de micosis fungoidea con posrospermias. *An Cir Med Argent* 15, 585-597.
53. Prophet, E.B., Mills, Bob, Arrington, Jacquelyn B., Sobin, Leslie H., 1995. *Métodos histotecnológicos*. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América, Washintong, D.C.

54. Quigley, R.R., Knowles, K.E., Johnson, G.C., 2009. Disseminated chlorellosis in a dog. *Vet Pathol* 46, 439-443.
55. Ramirez-Romero, R., Silva-Perez, R.A., Lara-Arias, J., Ramirez-Hernandez, C., Marino-Martinez, I.A., Barbosa-Quintana, A., Lopez-Mayagoitia, A., 2015. Coccidioidomycosis in Biopsies with Presumptive Diagnosis of Malignancy in Dogs: Report of Three Cases and Comparative Discussion of Published Reports. *Mycopathologia*.
56. Ramírez-Romero, R., Nevarez-Garza, A., Frautro-Rodríguez, J., Andrade-Manjarrez, E., 1991. Coccidioidomycosis diseminada en el perro: presentacion de un caso. *Veterinaria México* 22, 181-184.
57. Rosai, J., 2007. Why microscopy will remain a cornerstone of surgical pathology. *Laboratory Investigation* 87, 403-408.
58. Rowell, J.L., McCarthy, D.O., Alvarez, C.E., 2011. Dog models of naturally occurring cancer. *Trends Mol Med* 17, 380-388.
59. Schwartz, R.A., Lamberts, R.J., 1981. Isolated nodular cutaneous coccidioidomycosis. The initial manifestation of disseminated disease. *J Am Acad Dermatol* 4, 38-46.
60. Sengüven, B., Baris, E., Oygur, T., Berktaş, M., 2014. Comparison of Methods for the Extraction of DNA from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Archival Tissues. *Int J Med Sci* 11, 494-499.
61. Shubitz, L.F., Dial, S.M., 2005. Coccidioidomycosis: a diagnostic challenge, *Clin Tech Small Anim Pract, United States*, pp. 220-226.
62. Shubitz, L.F., Dial, S.M., Galgiani, J.N., 2011. T-lymphocyte predominance in lesions of canine coccidioidomycosis. *Vet Pathol* 48, 1008-1011.
63. Smitherman K, R.M., 2014. Coccidioidomycosis Mimicking Pelvic Sarcoma (abstract). *Journal of Hospital Medecine* 9 (suppl 2). <http://www.shmabstracts.com/abstract/coccidioidomycosis-mimicking-pelvic-sarcoma/>.
64. Sánchez-Hernández, C.R.G., Peña-Ruelas, C.I., Montemayor-Chapa, M., González-Cabello, D., Aguilar-Macías, R., 2015. Coccidioidoma como

simulador de neoplasia pulmonar. A propósito de un caso. *Medicina Interna de México* 28, 77-80.

65. Stieglitz, E., Hsiang, M.S., Simko, J.P., Hirose, S., Goldsby, R.E., 2014. Pulmonary coccidiomycosis masquerading as refractory metastatic Ewing sarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 36, e57-60.
66. Umeyama, T., Sano, A., Kamei, K., Niimi, M., Nishimura, K., Uehara, Y., 2006. Novel Approach to Designing Primers for Identification and Distinction of the Human Pathogenic Fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR Amplification, *J Clin Microbiol*, pp. 1859-1862.
67. Vince, A.R., Pinard, C., Ogilvie, A.T., Tan, E.O., Abrams-Ogg, A.C., 2014. Protothecosis in a dog. *Can Vet J* 55, 950-954.
68. Wolbach, S.B., 1904. The Life Cycle of the Organism of "Dermatitis Coccidioides." 1. *J Med Res* 13, 53-60 55.
69. Wu, J.S., Hochman, M.G., 2009. Soft-tissue tumors and tumorlike lesions: a systematic imaging approach, *Radiology*, Rsna, 2009., United States, pp. 297-316.
70. Ziller-Ortiz, H., 2004. Clasificación histopatológica de tumores mamarios caninos extraídos en clínicas veterinarias de la ciudad de Santiago, Chile, Instituto de Patología Animal, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile, p. 65.

9. RESUMEN BIOGRÁFICO

Rolando Antonio Silva Pérez

Candidato para el Grado de Maestro en Ciencia Animal

Tesis: FRECUENCIA DE NEOPLASIAS EN PERROS EN EL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY, N.L. Y COCCIDIOIDOMICOSIS EN ALGUNOS CASOS CON SOSPECHA ORIGINAL DE NEOPLASIA.

Campo de Estudio: Ciencias Veterinarias

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 7 de Julio de 1990, hijo de Rolando Silva Morales y Armandina Pérez Martínez.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Médico Veterinario Zootecnista en el 2014 con mención honorífica, segundo lugar de generación y puntuación sobresaliente en el Examen General para el Egreso de Licenciatura (EGEL).

Experiencia Profesional: Médico Titular en Clínica Veterinaria Zago desde Diciembre del 2016.