

MORFOGENESIS DE HONGOS DEMATIACEOS: II. ESTUDIO COMPARATIVO DE CEPAS AISLADAS DE SUELOS CON *FONSECAEA PEDROSOI*.(*)

Laura L. Ramos, Alfredo L. Borghi y Blanca J. C. de Bracalenti

Departamento de Microbiología.

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.

Universidad Nacional de Rosario.

Suipacha 531. Rosario (2000). Santa Fe. República Argentina.

RESUMEN

Se efectuó un estudio comparativo entre 5 cepas de hongos dematiáceos (levaduriformes y filamentosos) aislados de suelos con una cepa de *Fonsecaea pedrosoi*.

En cuanto a su patogenicidad una de ellas con características del género *Wangiella* mostró un proceso inflamatorio en las patas de los ratones inoculados en menor grado que *Fonsecaea pedrosoi* y manteniendo su forma levaduriforme.

INTRODUCCION

Según Ajello (1) las levaduras negras o "levaduras pretas" son definidas como hongos filamentosos dematiáceos, los cuales en ciertas etapas de su desarrollo, y bajo ciertas condiciones ambientales, tienen una fase unicelular durante la cual la multiplicación es por un proceso de brotación. Las colonias en esta etapa son cremosas con tinte negro. Como estos hongos se encuentran saprofiticamente en la madera (4), pulpa de madera (2) (3), y restos de plantas de suelo (7) nos interesa realizar un estudio comparativo entre cepas de hongos dematiáceos (levaduriformes y filamentosos) aislados de suelos con una cepa de *Fonsecaea pedrosoi* con el fin de aportar nuevos datos al estudio del dimorfismo y patogenicidad de las mismas. Además de realizar algunos estudios macro, micromorfológicos y biológicos orientados hacia un enfoque taxonómico.

(*) Este trabajo se realizó con un Subsidio proporcionado por Resolución N° 1501/84 del CONICET. (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

SUMMARY

[*Morphogenesis in dematiaceous fungi II. A comparative study of strains isolated from soils with Fonsecaea pedrosoi*].

A comparative study among 6 strains of dematiaceous fungi (yeast-like and filamentous form) isolated from soils, and a strain of *Fonsecaea pedrosoi* was done.

Concerning to their pathogenicity, one of them that had characteristics of the *Wangiella* genus, showed an inflammatory process in the foot of the inoculated mice not so important as in *Fonsecaea pedrosoi*, and presenting a constant yeast-like form.

MATERIALES Y METODOS

Nueve muestras de tierras tomadas de la capa superficial fueron recogidas de una región rural de la provincia de Santa Fe con implementos estériles, colocadas en bolsas de polietileno, y mantenidas a 4° C hasta su procesamiento.

Las muestras 1 y 5 fueron extraídas de la tierra acumulada de sauces viejos (*Salix babylonica*). La muestra 2 corresponde a un material de tronco de ombú (*Phytolacca dioica*) y las muestras 3 y 4 del mismo tipo de material de madera de morera de papel (*Broussonetia papyrifera*) y eucalipto (*Eucalyptus globulus*). Mientras que las muestras 6, 7, 8 y 9 corresponden a suelos extraídos de un sembrado de soja.

Procedimiento para su aislamiento:

Las muestras fueron procesadas según el método utilizado por Gezuele y col. (6) empleándose tubos de 70 cm³ con tapón a rosca y cada uno de

ellos fue ocupado por una muestra al quinto de su capacidad, completando casi su volumen total con una solución de NaCl al 0,85%. Después de 5 minutos de riguroso agitación las suspensiones fueron colocadas por 5-10 minutos en reposo. Ocho cm³ del sobrenadante, algunas veces bajo la flotación de restos de plantas, fueron pipeteados dentro de un tubo de ensayo con 2 cm³ de solución de penicilina-estreptomicina, 5 y 4 mg/cm³ respectivamente.

Para el aislamiento se emplearon los siguientes medios de cultivo: Sabouraud glucosa (Sbg); agar-cerebro-corazón (A.C.C.) con antibióticos y Mycobiotic agar (M.A.).

Todos los aislamientos se realizaron por duplicado utilizando todos los medios de cultivo señalados y sembrando en cada una de las placas una y dos gotas de la suspensión respectivamente incubándose a 28° C durante 5 semanas. Las colonias que mostraban características dematiáceas fueron transferidas a tubos de ensayo conteniendo los medios de cultivo mencionados.

Estudio morfológico:

Para el estudio macro y micromorfológico los aislamientos se sembraron en los medios Sbg y agar-papa-zanahoria (A.P.Z.) incubándose a 27° C durante 20 días.

Estudio de las características biológicas:

La termotolerancia: de los aislamientos fue determinada en tubos de ensayo conteniendo Sbg e infusión cerebro corazón glucosa (1%) agar. Cada grupo de tubos fueron mantenidos en cámara húmeda a 37° C y 40° C durante 4 semanas.

La descomposición del almidón: fue probada en el medio compuesto de 0,2% de almidón soluble, 1% de peptona y 0,6% de glucosa. Etanol yodado al 50% fue usado como indicador después de las 4 semanas de incubación a 27° C.

La actividad proteolítica: fue ensayada en el medio conteniendo infusión cerebro-corazón (25 grs.), gelatina (120 grs.), agua destilada (1000 cm³) y su pH = 7,2 - 7,4 incubándose a 27° C durante 4 semanas para comprobar la licuación o no de la gelatina.

La acción de la luz ultravioleta: se realizó en los medios de Sbg y A.P.Z. colocándose las distintas cepas a una distancia de 20 cm. durante períodos de tiempo de 1, 5, 10, 30, 90 minutos y 4 horas para observar si estas cepas se mantenían o no viables.

Estudio de patogenicidad:

Se utilizó la técnica empleada por González Ochoa y col. (5) que consiste en inocular una suspensión del hongo *F. pedrosoi* en la almohadilla plantar de ratones lográndose la transformación morfogénica similar a la que se encuentra en las lesiones humanas.

Se emplearon 20 ratones Rockland blancos macho de 18-20 grs. de peso.

Para la preparación del inóculo se tomaron colonias de las cepas en estudio, con un desarrollo de 10 a 15 días en Sbg e incubadas a 28° C, realizándose una suspensión por arrastre del desarrollo en superficie con solución fisiológica lo más homogénea posible conteniendo 10 mg. del hongo por 0,1 cm³ de solución.

Se inocularon los 20 ratones en la almohadilla plantar con 0,1 cm³ del inóculo sacrificándose a los 15 días aquellos ratones que hayan presentado en sus patas una inflamación considerable reinoculando los sobrantes. La experiencia se realizó durante un período de 45 días.

Las patas inoculadas fueron fijadas en formol al 10% descalcificándose con ácido tricloroacético e incluyéndose en parafina para los estudios histopatológicos. Las coloraciones realizadas fueron: Gomori-Grocott (G.G.), PAS y Hematoxilina-eosina (H.E.).

RESULTADOS

De las 9 muestras procesadas, 5 de ellas desarrollaron hongos dematiáceos y ninguna fue semejante a la cepa patógena tanto micromorfológica como biológicamente.

Morfología.

a) Características macroscópicas:

Las características macromorfológicas de las colonias que se describen en el Cuadro 1 se obtuvieron en el medio de Sbg a 28° C durante 20 días de incubación.

b) Características micromorfológicas:

Cepa N° 2: micelio pigmentado delgado, septado con conidióforos bien diferenciados denticulados nudosos en sus extremos. Los conidios están ubicados en el ápice y en los lados de la célula conidiogena y unidos por un corto denticulo. Son ovoides a cilíndricos de 1,5-2 μ de ancho por 3-5 μ de largo, hialinos a subhialinos unicelulares.

CUADRO Nº 1

Nº de cepa	Aspecto de las colonias en Agar Sabouraud glucosado (anverso y reverso)
2	Aterciopelada, centro elevado, con radiaciones, bordes regulares color verde oliváceo. Reverso: color verde oliváceo.
4	Aterciopelada, centro elevado, algunas estriaciones, bordes regulares color verde oliváceo. Reverso: color verde oliváceo claro.
6	Cremosa de color negro y brillante, aspecto de colonia levaduriforme. Reverso: color negro.
8	Cremosa de color negro y brillante, aspecto de colonia levaduriforme. Reverso: color negro.
9	Cerebriforme con bordes irregulares color verde oscuro. Reverso: color verde oscuro.
Fonsecaea pedrosoi	Aterciopelada, centro elevado, bordes regulares, color verde oliva. Reverso: color verde oliva.

Cepa Nº 4: micelio pigmentado delgado, septado. Conidios oscuros que se originan de conidióforos cortos naciendo del extremo y permaneciendo agrupados a su alrededor. Son de forma elíptica unicelulares de 1,5-2,5 μ de ancho por 3-4,5 μ de largo.

Cepa Nº 6 y 8: Se observa hifas pigmentadas de aspecto toruloide y células levaduriformes en brotación. Conidióforos indiferenciados que dan origen lateralmente o apicalmente a células conidiógenas en forma de fiálide sin collarite visible. Conidios café pálidos unicelulares reunidos en racimos sobre la célula conidiógena subglobosos a ovoides de 3-4 x 4-6 μ .

Células levaduriformes libres de 3-5 x 4-7 μ .

Cepa Nº 9: micelio pigmentado septado con clamidosporas intercalares y con conidióforos erectos que dan origen a cadenas ramificadas acropétalas de blastoconidios lisos a levemente rugosos, de 1,5 - 3 μ de ancho por 2 - 7,5 μ (Figura 3).

Características biológicas:

a) Termotolerancia: solamente la cepa Nº 8

se desarrolló a 37° C no haciéndolo a 40° C. Las cepas Nº 2, 4, 6 y 9 no se desarrollaron en este rango de temperatura mientras que la de *F. pedrosoi* fue termotolerante entre 37 y 40° C.

b) Descomposición del almidón: únicamente la cepa Nº 9 hidrolizó el almidón, no haciéndolo las restantes incluyendo *F. pedrosoi*.

c) Actividad proteolítica: *F. pedrosoi* no licuó la gelatina mientras que sí lo hicieron las cepas en estudio.

d) Actividad de la luz ultravioleta: durante los períodos de tiempo empleados, todas las cepas junto a *F. pedrosoi* mantuvieron sus viabilidades.

Patogenicidad:

Los resultados microscópicos obtenidos con las coloraciones de G.G., PAS y H.E. fueron los siguientes:

Cepa Nº 2: Con PAS: no hay proceso inflamatorio.

Con G.G.: no hay proceso inflamatorio y se observan escasas cadenas de conidios.

Cepa No 4: con PAS: existe un proceso inflamatorio leve.

Con G.G.: no se observan elementos fúngicos.

Cepa No 6: a los 15 días de la inoculación; con PAS: intenso proceso inflamatorio crónico de disposición granulomatosa en dermis superficial y profunda.

con G.G.: se observan abundantes elementos levaduriformes brotantes pigmentados.

A los 15 días de la segunda inoculación, con PAS: el estudio histológico permite observar a nivel de la dermis media, profunda y tejido subcutáneo un proceso inflamatorio crónico de jerarquía. Este se halla constituido por células inflamatorias mononucleadas e histiocitos. Además hay algunos PMN. Las células inflamatorias se agrupan formando granulomas. Cabe destacar que el infiltrado inflamatorio compromete además al tejido muscular y en un foco se reconoce un filete nervioso con células inflamatorias.

Con G.G.: se observa gran cantidad de elementos pigmentados levaduriformes. Ellos se ubican preferentemente entre las células inflamatorias que componen a los granulomas (Figura 5).

A los 30 días de la segunda inoculación: con PAS: no se observa proceso inflamatorio.

con G.G.: no se observa reacción inflamatoria ni elementos fúngicos.

Cepa No 8: con PAS: aislados elementos inflamatorios crónicos.

con G.G.: muy pocos elementos levaduriformes pigmentados.

Cepa No 9: con PAS: no se reconoce proceso inflamatorio.

Con G.G.: se observa regular cantidad de células pigmentadas en grupos y en cadenas sin haber proceso inflamatorio.

Cepa de *F. pedrosoi*: a los 15 días de la inoculación; con H.E.: hubo ulceración de la epidermis con una costra fibrohemática a ese nivel. Por debajo de esta lesión y ocupando toda la dermis, se encontró un intenso infiltrado inflamatorio de aspecto granulomatoso.

con G.G.: se observaron filamentos pigmentados y células esclerótiles en distintos estadios de formación.

A los 30 días de inoculación, con H.E.: en toda la extensión de la dermis superficial existió

un infiltrado inflamatorio granulomatoso.

con G.G.: se observaron filamentos pigmentados correspondientes a la reinoculación de *F. pedrosoi* y células esclerótiles pertenecientes a la primera inoculación.

A los 45 días de inoculación, con H.E.: había un infiltrado inflamatorio muy intenso fundamentalmente agudo con áreas de necrosis.

con G.G.: se observaron filamentos pigmentados y células esclerótiles en distintos estadios de formación

DISCUSION Y CONCLUSIONES

González Ochoa y col. (5) emplearon cepas de *F. pedrosoi* de no más de 3 años de conservación obteniendo la transformación al cabo de un año.

En un trabajo anterior nuestro (8) y utilizando esta misma técnica inoculamos ratones con una cepa de *F. pedrosoi* de 7 años de conservación, lográndose al cabo de 15 días los mismos resultados que los autores anteriormente citados.

En cuanto a su patogenicidad solamente la cepa No 6, que probablemente corresponda al género *Wangiella*, mostró en las patas de los ratones inoculados un proceso inflamatorio, en menor grado que *F. pedrosoi*, manteniendo su fase levaduriforme. Debiendo destacar que la lesión en el animal no tomó características de cronicidad como la cepa testigo puesto que a los 45 días ésta se reabsorbió.

En cuanto a las transformaciones morfológicas se observó que no hay modificaciones "in vivo" e "in vitro" como lo hace *F. pedrosoi*.

Desde el punto de vista de las inoculaciones y de las pruebas biológicas no llegamos a conclusiones definitivas como para poder clasificarlas taxonómicamente.

De acuerdo a lo realizado hasta el presente se puede inferir con cierta aproximación que las cepas No 6 y 8 coincidirían con algunas de sus características con el género *Wangiella* mientras que la cepa No 2 tiene una reproducción tipo *Rhinocladiella* y la No 9 tipo *Cladosporium*.

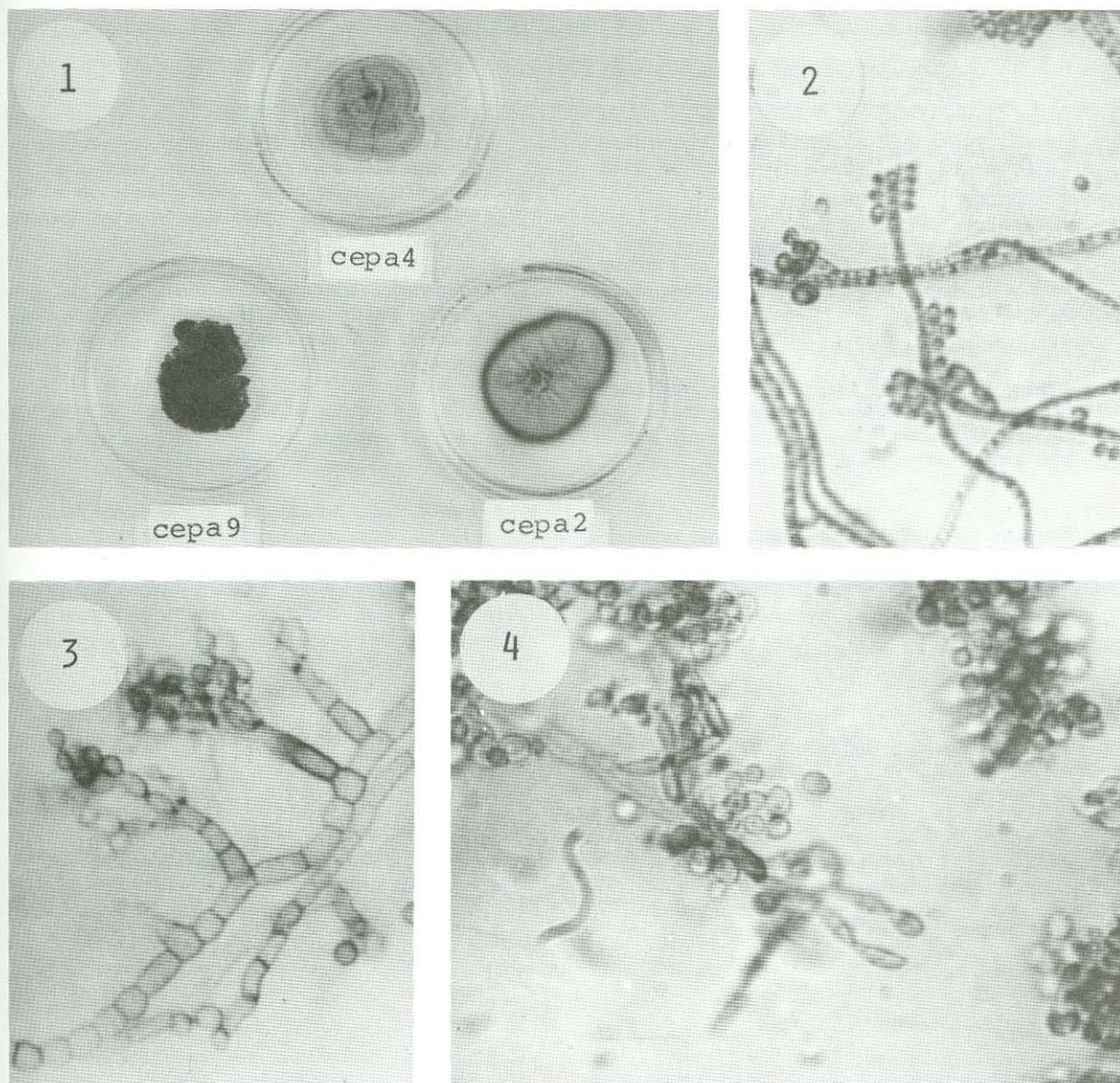


Figura N° 1: Colonias de las cepas aisladas N° 2, 4 y 9 en Sbg a los 15 días de desarrollo a 28° C.

Figura N° 2: Micromorfología de la cepa N° 2 con reproducción tipo *Rhinocladiella* x 450.

Figura N° 3: Micromorfología correspondiente a la cepa N° 9 con clamidoconidios y reproducción tipo *Cladosporium* x 450.

Figura N° 4: Micromorfología correspondiente a las cepas N° 6 y 8 mostrando elementos levaduriformes y filamentosos x 450.

Figura N° 5: Elementos levaduriformes dematiáceos ubicados entre las células inflamatorias que componen los granulomas x 450.

REFERENCIAS

- 1) Ajello Libero (1977): The Black Yeasts of Disease Agents. Proceedings of the Fourth International Conference on the Mycoses. The Black and White Yeasts: 9, 15.
- 2) Conant, N.F. (1937): The occurrence of a human pathogenic fungus as a saprophyte in nature. Mycologia 45: 947-950.
- 3) Conant, N.F. y Martin, D.S. (1937). The morphologic and serologic relationships of the various fungi causing dermatitis verrucosa (Chromoblastomycosis). American Journal of Tropical Medicine, 17: 553-576.
- 4) Emmons, C.W. (1954). The significance of saprophytism in the epidemiology of the mycoses. Transaction of the New York Academy of Sciences, 17, 157-166.
- 5) García Elorriaga G., González Ochoa A. and Vargas Ocampo F. (1980). Experimental reproduction of Chromoblastomycosis with some feature of the human disease in white mice. Proceedings of the Fifth International Conference on the Scientific Publication N° 396. PAHO, 265-268.
- 6) Gezuele E., Mackinnon J.E. and Conti-Díaz, I.A. (1972). The frequent isolation of Phialophora verrucosa and Phialophora pedrosoi from natural sources. Sabouraudia. 10, 266-273
- 7) Klite, P.B.; Kelley, H.B. and Diercks, F.N. (1965). A new soil sampling technique for pathogenic fungi. American Journal of Epidemiology, 31: 124-130.
- 8) Ramos, L.L.; Borghi, A.L. y Bracalenti, B.J.C. de (1981). Cromoblastomycosis Experimental. Trabajo presentado en las X Jornadas Argentinas de Micología. Tucumán, 1981.