

MORFOGENESIS DE HONGOS DEMATIACEOS IV: INFLUENCIA DEL MEDIO ACIDO SOBRE LA MORFOLOGIA DE FONSECAEA PEDROSOI Y WANGIELLA DERMATITIDIS

Laura L. Ramos y Alfredo L. Borghi

Departamento de Microbiología (Area Micología)
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.
Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531,
Rosario (2000), Santa Fe, República Argentina

Palabras clave: Morfogénesis, *Fonsecaea pedrosoi*, *Wangiella dermatitidis*, pH.

Key words: Morphogenesis, *Fonsecaea pedrosoi*, *Wangiella dermatitidis*, pH.

RESUMEN

Se sometió a la acción de ácido clorhídrico y ácido cítrico a pH = 1,5 una cepa de *Fonsecaea pedrosoi* (CMUR 263/74) y una de *Wangiella dermatitidis* (CMUR 104/81) productoras de Cromoblastomycosis y Faeohifomycosis, respectivamente, con el objeto de producir cambios en su morfología.

A través de sucesivos pasajes por ácido, siembra en medio de Sabouraud Glucosa y Agar Sangre, se logró producir cepas despigmentadas sometiéndolas posteriormente a diversas pruebas. Se estudió la patogenicidad en la almohadilla plantar de ratones donde la cepa de *F. pedrosoi* testigo produjo células escleróticas en cambio su correspondiente albina no mostró capacidad para producirlas.

Las cepas de *W. dermatitidis* testigo y albina, solamente produjeron elementos levaduriformes.

De acuerdo a los resultados obtenidos, estos hongos al despigmentarse por acción de un pH muy bajo (pH=1,5), cambian sus características morfológicas y su acción patógena, diferenciándose de su estado original.

SUMMARY

[Morphogenesis in Dematiaceous fungi IV: Influence of acid media over the morphology of *Fonsecaea pedrosoi* and *Wangiella dermatitidis*.]

Fonsecaea pedrosoi (strain CMUR 263/74) and *Wangiella dermatitidis* (strain CMUR 104/81), which produce Phaeohyphomycosis and Chromoblastomycosis respectively, were subjected to chlorhydric and citric acid treatment (pH = 1,5) in order to produce changes in their morphology.

Non-pigmented mutant strains were obtained after successive acids treatments and growth in Sabouraud Glucose and Blood Agar.

The pathogenicity on the footpads of mice of the wild-type strains and their non-pigmented mutants was studied, and it was observed that *F. pedrosoi* produced sclerotic cells, while its corresponding non-pigmented mutant did not show any effect on the footpads at mice. *W. dermatitidis* and its corresponding non-pigmented strain only produced yeast-like cells on the described test.

According to these results, the non-pigmented mutants obtained after acid treatment changed their morphological characteristics and pathogenic actions.

INTRODUCCION.

Wangiella dermatitidis (Kano) Mc Ginnis (6) es un hongo patógeno dematiáceo polimórfico que

causa Faeohifomycosis cutánea y diseminada. En los tejidos del hospedador desarrolla elementos miceliales pigmentados que consisten en cortas cadenas de cinco células de pared gruesa pero nunca en

forma de células esclerotiales.

Fonsecaea pedrosoi (Brumpt) Negróni es un hongo patógeno dematiáceo polimórfico que causa Cromoblastomycosis (7), desarrolla en los tejidos del hospedador células de pared gruesa, pigmentadas, conocidas como células esclerotiales o cuerpos fumagoides que se dividen por septación y no por brotación.

Wangiella dermatitidis se expresa mediante diversos fenotipos vegetativos, los cuales corresponden a una forma micelial y levaduriforme (4) (8). Sin embargo, la forma hifal es única y algunas veces es su característica principal en los tejidos infectados. El mecanismo que regula la transición de la forma levaduriforme ha sido poco estudiado debido a la incapacidad general para inducir la morfología hifal in vitro (1) (5). Esta dificultad fue parcialmente resuelta al observar que bajo condiciones de cultivo ácido se induce la transición de la forma levadura a la hifal (13).

Oumaima Ibrahim y col. (9) usando la mismas condiciones que para **W. dermatitidis**, y cultivando en medios muy ácidos, lograron inducir in vitro células levaduriformes en una cepa de **F. pedrosoi**, la cual subcultivada a pH = 5,5 revirtió a la morfología hifal.

El pH extracelular no tiene una influencia esencial sobre el pH citoplasmático, por lo tanto, los efectos pueden ser indirectos, ya sea sobre la superficie celular o sobre los componentes extracelulares, probablemente actúa sobre los constituyentes del medio o sobre los componentes metabólicamente activos de la pared celular y de otras membranas superficiales (3).

El objetivo de este trabajo fue obtener cepas mutantes albinas de **F. pedrosoi** y **W. dermatitidis** bajo la acción de los ácidos cítricos y clorhídrico a pH muy bajos (pH = 1,5) y comprobar si la pérdida de la pigmentación alteraba de alguna manera el comportamiento normal de estos hongos en cuanto a su patogenicidad.

MATERIALES Y METODOS.

1. **Cepas objeto de este estudio** (CMUR: Colección de Micología Universidad de Rosario)

Se emplearon una cepa de **F. pedrosoi** (CMUR 243/74) y una de **W. dermatitidis** (CMUR 104/81) que fueron mantenidas en Agar Sabouraud Glucosa (ASG) y Agar Papa Dextrosa (APD) a 27° C.

2. **Obtención de cepas albinas por acción de los ácidos cítrico y clorhídrico sobre *F. pedrosoi* y *W. dermatitidis*.**

Se colocaron 10^6 levaduras/cm³ de **W. dermatitidis** y 10 mg. de **F. pedrosoi** en 2 cm³ de HCl ($3,16 \times 10^{-2}$ mol/l) y ácido cítrico ($3,16 \times 10^{-2}$ mol/l) ambos a pH = 1,5 y se incubaron a temperatura ambiente durante 24 y 48 horas, sembrándose posteriormente en ASG y Agar Sangre (AS) a 28° C. Este tratamiento se efectuó tantas veces como fue necesario hasta obtener la despigmentación de dichas cepas.

3. Estudio de la patogenicidad.

Se emplearon 32 ratones Rockland blancos machos de 18-20 g. de peso.

Las cepas estudiadas fueron: **W. dermatitidis** como agente productor de Faeohifomicosis y su correspondiente albina y como productor de Cromoblastomycosis se empleó una cepa de **F. pedrosoi** y su correspondiente albina.

Para la preparación del inóculo se tomaron colonias de las cepas en estudio con un desarrollo de 7 a 15 días en ASG a 28° C, realizándose una suspensión homogénea en solución fisiológica, conteniendo para **F. pedrosoi** y su albina 10 mg. del hongo por 0,1 cm³ de solución y para **W. dermatitidis** y su albina 10^6 levaduras/cm³. Se inocularon los ratones en la almohadilla plantar con 0,1 cm³, sacrificándose a los 15 días aquéllos que hubieran presentado una inflamación considerable en el punto de inoculación. La experiencia se realizó durante un período de 45 días.

Las patas 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.), Hematoxilina eosina (HE) y ácido peryódico de Schiff (PAS).

RESULTADOS.

Cuando las cepas de **F. pedrosoi** y **W. dermatitidis** fueron mantenidas 24 horas en ácido cítrico y posteriormente sembradas en AS se obtuvieron sus mutantes albinas en el primer pasaje. Cuando fueron sometidas a la acción del ácido clorhídrico por 24 horas y posteriormente sembradas en AS, **F. pedrosoi** se transformó en su mutante albina en el tercer pasaje mientras que **W. dermatitidis** requirió cuatro pasajes.

La siembra en AS luego del pasaje en medio ácido, fue requisito indispensable para la producción de cepas albinas.

Cuando **F. pedrosoi** y **W. dermatitidis** fueron mantenidas 48 horas en ácido cítrico y posteriormente sembradas en AS se lograron ambas

mutantes albinas en el primer intento mientras que con ácido clorhídrico se requirieron 2 y 3 pasajes para ambas cepas.

En el cuadro 1 se analizan las características macromorfológicas de las cepas albinas estudiadas (Foto 1 - 2).

Respecto a su micromorfología la mutante albina de *F. pedrosoi* presentó un micelio tabicado delgado hialino con numerosos conidios pequeños de 2 x 1,5 μ m, ovoides que nacen en el extremo de la hifa. (Foto N°3).

La mutante albina de *W. dermatitidis* se caracterizó por presentar un micelio delgado, tabicado, hialino, con uno o varios locus conidiógenos en los extremos de las hifas con conidios pequeños, alargados de 7,5 x 3,5 μ m coexistiendo con formas levaduriformes redondeadas de 3,8 x 3,5 μ m. (Foto N° 4.)

En el análisis de trabajos anteriores Ramos y col. (1981-1983), estudia la patogenicidad de cepas de *F. pedrosoi* y *W. dermatitidis* en ratones inoculados en la almohadilla plantar. Siguiendo con la misma metodología se analizó lo que ocurría histológicamente con las cepas albinas de los hongos citados anteriormente.

Se observó en dos cortes coloreados con H.E., *F. pedrosoi* produjo a los 15 días de inoculación, un proceso inflamatorio intenso, granulomatoso constituido por mononucleares, histiocitos, linfocitos y neutrófilos aislados. La tinción con G.G. revelaron abundantes elementos levaduriformes. Los cortes realizados a los 30 días de inoculación y coloreados con H.E. presentaron el mismo proceso anterior, pero a la tinción de G. G, regular cantidad de células levaduriformes.

Los cortes realizados a los 45 días y coloreados con H.E. presentaron un proceso inflamatorio leve con mononucleares e histiocitos y los con G.G. una disminución en el número de células levaduriformes.

En las mismas condiciones de experimentación la cepa de *W. dermatitidis* albina, a los 15 días de inoculación en preparados con H.E. se observó un leve proceso inflamatorio con mononucleares e histiocitos y con G.G., abundantes elementos levaduriformes. A los 30 días de inoculación y con H.E. mostraron un moderado proceso inflamatorio con mononucleares e histiocitos y con G.G. una regular cantidad de elementos levaduriformes. A los 45 días ya sea con H.E. como con G.G. se obtuvo el mismo resultado que a los 30 días.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La ultraestructura en la pared del conidio en los Deuteromycetes esta formado por tres capas esenciales: una capa externa (A), una media fundamental en todos los conidios (B) y una interna que existe solamente en algunos (C). En los hongos dematiáceos la Capa B está diferenciada en dos zonas por la melanización: una zona permanece hialina (B 1) y la otra (B 2) se torna pigmentada (2). Es posible destruir la zona B 2 por acción de una solución de KMnO_4 seguida por tratamiento con ácido orgánico, mientras que la zona B 1 permanece inalterada.(12).

Cuadro N° 1

Descripción macromorfológica de las cepas de *F. pedrosoi* y *W. dermatitidis* albinas en los medios de ASG y APD a los 27° C.

Cepas	Aspecto de las colonias en ASG (anverso y reverso)	Aspecto de las colonias en APD (anverso y reverso)
<i>F. pedrosoi</i> albina	Afelpada, acuminada, bordes radiados, color blanco cremoso. Diámetro de la colonia a los 15 días: 2,8 cm. Reverso: color beige.	Aterciopelada, centro ligeramente acuminado, color blanco. Diámetro de la colonia a los 15 días: 1,9 cm. Reverso: ligeramente pardo.
<i>W. dermatitidis</i> albina	Afelpada, poco acuminada, bordes radiados, color beige. Diámetro de la colonia a los 15 días: 2,3 cm. Reverso: color beige.	Aterciopelada, blanca, muy poco acuminada. Diámetro de la colonia a los 15 días: 2,4 cm. Reverso: ligeramente pardo.

En nuestro caso, es probable que después del tratamiento con los ácidos cítrico y clorhídrico, se obtuvieron mutantes albinas debido a una interferencia producida en el mecanismo enzimático de la formación de la melanina a nivel de la Capa B de la pared celular (B 2).

De acuerdo a los resultados logrados, la obtención de estas mutantes albinas se vería reforzada por algún componente presente en la sangre que se agrega al medio de cultivo, las cuales nunca revirtieron a las formas originales en los subcultivos.

W. dermatitidis bajo la acción de los ácidos presentó cambios en el aspecto macroscópico de la colonia, pasando de levaduriforme a blanca afelpada; microscópicamente mostró un predominio de la forma micelial. En cambio *F. pedrosoi* desarrolló una colonia blanca afelpada con una mezcla

de micelio, conidio y formas levaduriformes.

Los resultados obtenidos en la inoculación de *F. pedrosoi* albina en ratones, produjo un proceso inflamatorio intenso, que en el transcurso del tiempo fue disminuyendo, demostrando así que las modificaciones morfológicas y la pérdida de su pigmento contribuyeron a la ausencia de células escleróticas características del estado dimórfico de *F. pedrosoi*. Cuando se inoculó *W. dermatitidis* albina en las mismas condiciones de experimentación se obtuvo un leve proceso inflamatorio con elementos levaduriformes morfológicamente similares a la cepa pigmentada de *W. dermatitidis*.

Según los resultados obtenidos, estos hongos al despigmentarse por acción de un pH muy ácido, cambian sus características morfológicas y su acción patógena.

REFERENCIAS

1. AL-DOORY, Y. (1972). Chromomycosis, pp. 118-146. Mountain Press Publishing Co., Missoula, Mont.
2. CAMPBELL, R. (1968). An electron microscope study of spore structure and development in *Alternaria*, *Stachybotrys atra*. New Phytol. 71: 1143-1149.
3. GRIFFIN, D.A. (1984). Fungal Physiology, pp. 162-163. A Wiley Interscience Publication, John Wiley and Sons. New York. Chichester. Brisbane. Toronto. Singapore.
4. GROVE, S.N., OUJEZDESKY K.B. AND SZANISZLO P. J. (1973). Budding in the dimorphic fungus *Phialophora dermatitidis*. J. Bacteriol., 115: 323-329.
5. JOTINSANKASA, V., NIELSEN H.S. AND CONANT N. F. (1970). *Phialophora dermatitidis*, its morphology and biology. Sabouraudia 8: 98-107.
6. MC GINNIS, M.R. (1977). *Wangiella dermatitidis* a correction. Mycotaxon 6: 367-369.
7. NEGRONI, P. (1936) Estudio del primer caso argentino de Cromoblastomycosis, *Fonsecaea* (Neg) *pedrosoi* (Brumpt) 1921. Dep. Nat. Higiene. Rev. Inst. Bacteriol. 7: 419-426.
8. OUJEZDESKY, K.B., GROVE, S.N. AND SZANISZLO, P.J. (1973). Morphological and structural changes during the yeast-to-mold conversion of *Phialophora dermatitidis*. J. Bacteriol. 113: 468-477.
9. OUMAIMA IBRAIM-GRANET, EVELINE GUEHO AND C. DE BIEVRE (1985). Induction of yeast-like cells in a strain of *Fonsecaea pedrosoi* cultured under very acidic conditions. Mycopathologia 90: 35-39.
10. RAMOS, L., BORGHI, A.L. Y BRACALENTI, B.J.C. DE (1986). Morfogénesis de hongos dematiáceos I: Cromoblastomycosis experimental. Boletín Micológico 3: 31-34.
11. RAMOS L., BORGHI A.L. Y BRACALENTI B.J.C. DE (1986). Morfogénesis de hongos dematiáceos II: Estudio comparativo de cepas aisladas de suelos con *Fonsecaea pedrosoi*. Boletín Micológico 1986, 3: 35-40.
12. REISINGER O. AND GUEDENET J.C. (1986). Morphologic ultrastructurale et critères taxinomiques chez les Deuteromycètes I. Les parois sporales chez *Dendryphiella virosa* (Berk-et-Curt). Bull. Soc. Mycol. Fr. 84: 19-26.
13. SZANISZLO P.J., HSICH P.H. AND MARLOWE J.D. (1976). Induction and ultrastructure of the multicellular (sclerotic) morphology in *Phialophora dermatitidis*. Mycologia 66: 117-130.

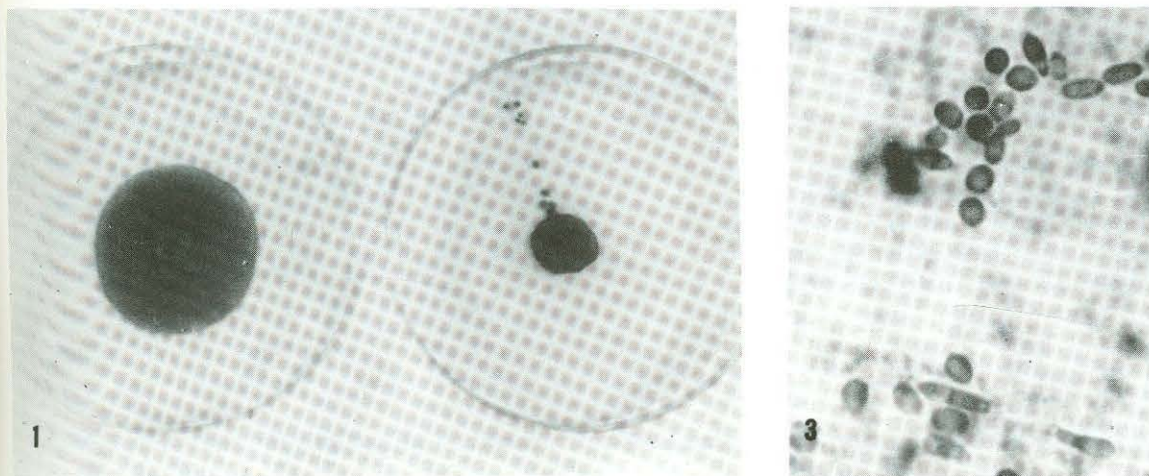


Foto 1: Colonias de *F. pedrosoi* (izq.) y *W. dermatitidis* (derecha) albinas en el medio de ASG a 27° C.
Foto 3: Micromorfología de *F. pedrosoi* albina mostrando elementos levaduriformes y micelio en ASGx450.

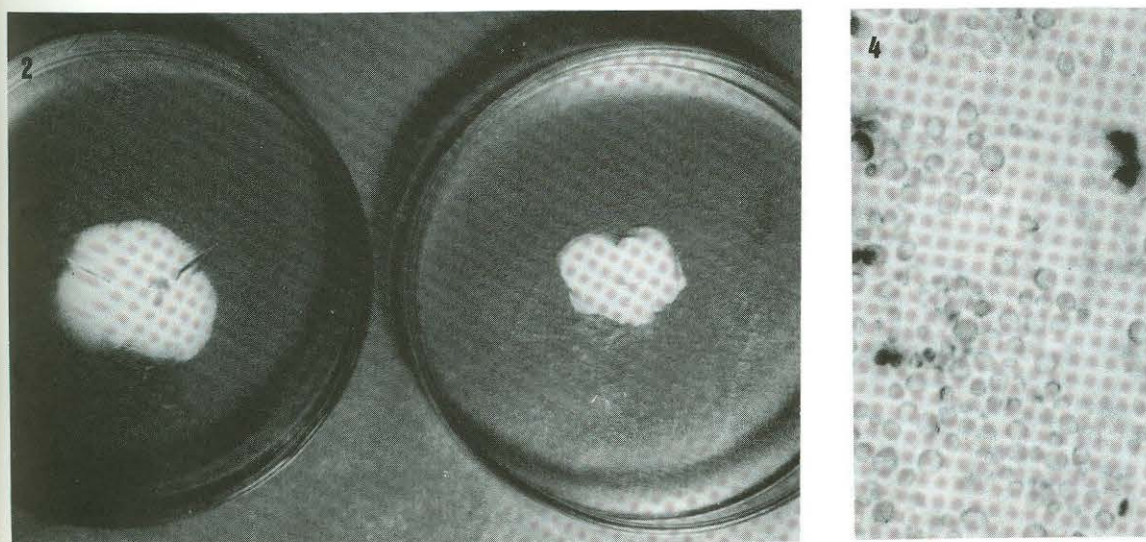


Foto 2: Colonias de *F. pedrosoi* (izq.) y *W. dermatitidis* (derecha) albinas en el medio de APD a 27° C.
Foto 4: Micromorfología de *W. dermatitidis* albina en ASG mostrando elementos levaduriformes y conidios alargados x 450.