

## Estudios sobre el "Coccidioides immitis" Rixford et Gilchrist. I Micelio vegetativo y de fructificación

Por P. NEGRONI

El *Coccidioides immitis* es un hongo patógeno para el hombre y los animales descubierto por A. Posadas, de Buenos Aires, en 1892 y, aún cuando su posición en la sistemática botánica no está definitivamente resuelta, muchos micólogos lo vinculan a los *Chytridiales* de la clase *Phycomycetes* (Negróni, 1946 y 1947).

Todos los investigadores han estudiado con particular interés el aspecto micromorfológico de este parásito en las lesiones donde adquiere los caracteres de la fructificación asexual (esporangio) lo cual ha permitido su ubicación sistemática. La existencia de probables fenómenos sexuales ha sido señalada por Ciferri y Redaelli en 1936<sup>(3)</sup> y por Negróni.<sup>(2)</sup>

Los caracteres microscópicos de los cultivos han cautivado, por el contrario, poco la atención de los micólogos. En este trabajo nos ocuparemos de este último tópico que hemos abordado al estudiar, comparativamente, algunas cepas autóctonas y otras norteamericanas.

Al observar el desarrollo del *C. immitis* en los medios artificiales de cultivo podemos apreciar la formación de un micelio aéreo, de un micelio superficial o rampante y de un micelio sumergido o profundo. El estudio microscópico del material tomado de estas formaciones nos permite diferenciar el micelio vegetativo que forma la masa de la colonia y es, tanto aéreo como superficial y sumergido, y un micelio de fructificación aéreo.

### MICELIO VEGETATIVO

Estudiaremos sucesivamente el micelio vegetativo común y formaciones especiales: clamidosporos, micelio en raqueta y órganos nodulares, apresorios y otras formaciones.

El micelio vegetativo común está constituido por una trama de filamentos ramificados con algunos caracteres particulares. Sus hifas son bastante rectas, poco flexuosas y con pocos tabiques. La

Presentado en la reunión de comunicaciones del 13 de abril de 1948.

formación de tabiques en el micelio vegetativo es poco común en los *Phycomycetes*, pero se los ha observado en especies de *Catenaria* y de *Endogone* y, justamente, su micelio poco tabicado afianzaría su posición entre los *Chytridiales*.

El micelio vegetativo no tiene un diámetro uniforme, sino, por el contrario sumamente variable. Es muy plástico. Al lado de filamentos de unas  $5\mu$  de diámetro se observan otro de  $1,40\mu$ , originándose, a veces, estos últimos como ramas del primero, según lo ilustra la Fig. 1. Otras veces un mismo filamento cambia bruscamente de diámetro en varios puntos de su trayecto, como si se observara una cinta de frente y de canto.

En los medios de cultivo adicionados de 1 % de diferentes grasas (animal o vegetal), el micelio se presenta aparentemente rugoso debido al depósito de finas gotitas de grasa.

*Clamidosporos*: Verdaderos quistes de un diámetro bastante mayor que el del filamento que los originan. Son generalmente aislados, intercalares o terminales y su diámetro medio oscila de  $14$  a  $16\mu$  (Fig. 1).

*Micelio en raqueta*: Mide en la parte dilatada unas  $6\mu$  de diámetro y  $3,50\mu$  de diámetro el filamento que origina la raqueta.

*Organos nodulares*: Fueron descriptos por Negroni y Villafañe Lastra en la cepa N° 1751 clasificada como *Trichosporon proteolyticum* desarrollada en el medio de Czapeck, pero donde las cepas lo forman con el máximo de desarrollo es en el medio sintético siguiente: Cloruro de amonio 1 %; acetato de sodio 1 %; fosfato tribásico de potasio 0,8 %; agar 2 % y 1 % de grasa animal (de cerdo, manteca), vegetal (aceite de oliva) o ácido oleico.

El examen microscópico del micelio desarrollado al cabo de pocos días de incubación a  $25^{\circ}\text{C}$  revela la formación de "primordiums" de pocas micras 2 a 3 de diámetro a expensas de filamentos de  $1,5\mu$  que, frecuentemente, concurren de dos o más puntos distantes (sinfiógenos). No hemos podido reconocer en estos ovillos o pelotones iniciales la diferenciación de hifa sexual alguna. El "primordium" aumenta de volumen por sucesivas ramificaciones de los filamentos, sin que éstos modifiquen, apreciablemente, su diámetro, y por la fusión con "primordium" vecinos hasta llegar a medir 1 a 2 mm. de diámetro. En este momento está formado por un plecténquima (prosénquima) en el cual los filamentos conservan aún su individualidad, sin que sea posible reconocer la formación de una corteza pseudoparenquimatosa y de una zona medular. Serían formaciones intermedias entre el bulbillo y el esclerote, mayores que el primero y sin los caracteres morfológicos del segundo.

Nosotros hemos seguido la evolución de estos esclerotes imperfectos durante algo más de tres meses, presentándose siempre macizos.

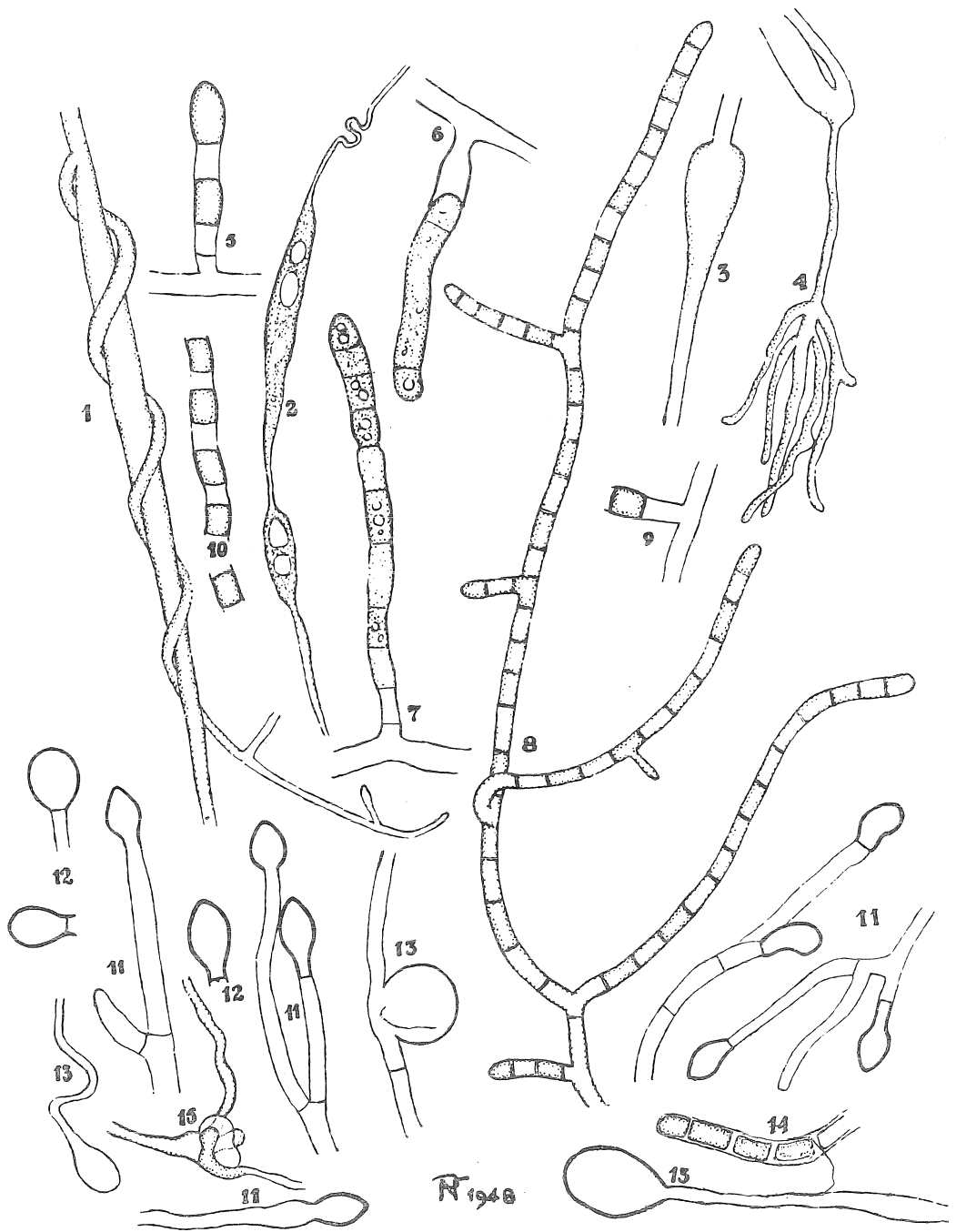


FIG. 1. — Diversos aspectos del micelio vegetativo y de fructificación tomados con la cámara clara; 1 y 2, micelio vegetativo de diámetro irregular; 3, micelio en raqueta; 4, apresorio; 5 a 10, micelio de fructificación consistente en la formación de "entosporos" separados por células vacías (separadores); 11 a 15, diversos aspectos de la cepa "Ota" tipo *Scopulariopsis*.

No se forman en su interior cavidades ni esporos. Cuando envejecen adquieren un tinte ligeramente pardusco.

La formación de estos elementos parece especialmente estimulada por la presencia de grasas, pues a menudo se los ve originarse en un glóbulo de grasa y, respecto a su significado, creemos que representan, probablemente, elementos de resistencia.

*Apresorios*: fueron también señalados por Negroni y Villafaña Lastra <sup>(4)</sup>. Se trata de un micelio fino de 1.50  $\mu$ , aproximadamente, ramificado, como raicillas o formando una especie de escobilla (Fig. 1 N° 4).

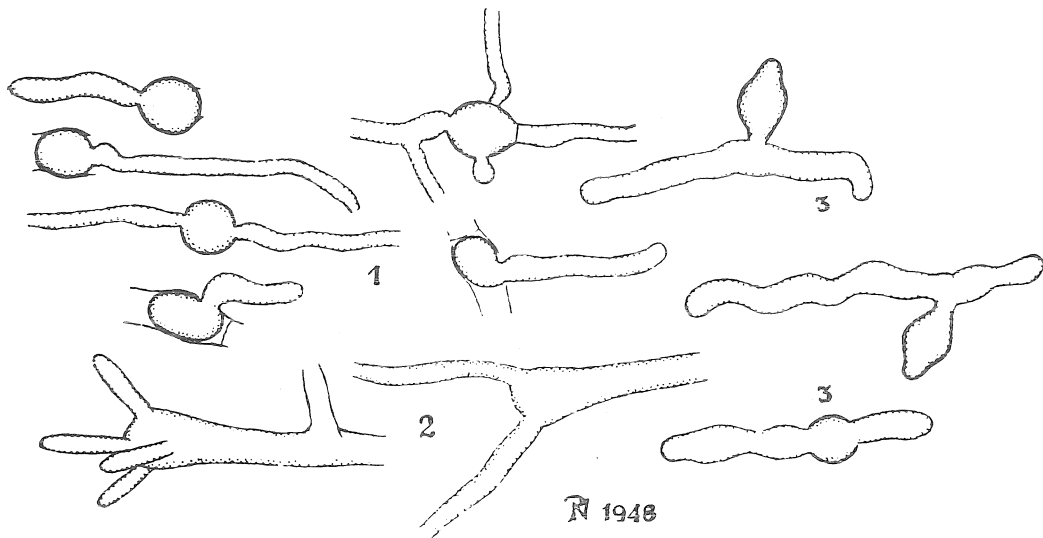


FIG. 2. — Germinación de los entosporos del *C. immitis*. En 1, se aprecia la existencia de una membrana propia; 2, micelio vegetativo con di y tetratomía; 3, germinación de los esporos de la cepa "Ota" tipo *Scopulariopsis*.

Otras formaciones vegetativas.

Micelio perforante o penetrante (*Durchwachsung* en alemán), lo hemos observado en algunos cultivos en medios con 1 % de grasa, así como la formación de anastomosis lateral entre hifas vegetativas y, finalmente, funiculos.

#### MICELIO DE FRUCTIFICACIÓN

La mayoría de los autores americanos ha descripto en este hongo la formación de elementos designados, frecuentemente, como clamidosporos y otras como astrosporos. Fué Emmos, C. W. <sup>(5)</sup> el primero en llamar la atención sobre su formación en ramas especiales del micelio aéreo.

Los mismos elementos habían sido descritos por Negroni y Villaña Lastra, en 1938 <sup>(4)</sup> en la cepa 1751 clasificada como *Trichosporon proteolyticum* y bautizados como *clamidoartrosporos* por poseer, aparentemente, caracteres de ambas formaciones.

El examen microscópico de los cultivos nos permite diferenciar tres tipos de clamidosporos: 1) clamidosporos comunes intercolares o terminales, de mayor diámetro que el filamento vegetativo, que ya hemos descrito. 2) clamidoartrosporo del micelio sumergido o superficial, y 3) clamidoartrosporos aéreos. Es sobre estos últimos que nos vamos a detener por considerarlos como una verdadera fructificación del micelio aéreo.

En los medios sólidos de cultivo, particularmente en los medios minerales (Stanford o Czapeck), ciertas cepas (Nº 695 y B) forman un micelio aéreo algodonoso o aracnoideo muy fino y más desarrollado en la zona periférica de la colonia. El examen microscópico de cultivos de 4 a 5 días permite apreciar que de la trama aérea del micelio vegetativo fino se desprenden filamentos granulados, sin vacuolas, con pocas granulaciones grasas y de un diámetro medio de 3,50  $\mu$ .

Un tabique basal separa la hifa terminal rica en protoplasma homogéneo, índice de su intensa actividad metabólica, del resto del micelio vegetativo. Este filamento fértil o *proconidia* se tabica en sentido basípeto, originando artículos isodiamétricos. El mismo proceso de tabicamiento en sentido basípeto tiene lugar en los filamentos fértiles ramificados, sin que hayamos podido notar que el tabicamiento del eje principal preceda al de las ramas, pareciendo ocurrir lo contrario, por lo menos en las ramas proximales.

Todo parecería indicar que se tratara de un simple fenómeno de artrosporulación; sin embargo la evolución posterior de estas hifas fértiles conduce a la formación de elementos particulares. En efecto, con bastante regularidad comenzando desde el vértice, es decir, en sentido basípeto, a una célula fértil sucede otra estéril, abortiva, que no evoluciona, y cuyo contenido celular desaparece posiblemente absorbido por las células fértiles vecinas. Repetimos que *la primera célula fértil es la apical*, de extremo redondeado y de base cortada a pico. Su diámetro es mayor que el de la última célula fértil, basal alargada y rectangular.

Las células fértiles quedan así delimitadas por dos tabiques formados "de novo" que se fusionan sólidamente a la pared de la hifa fértil. En las preparaciones montadas en el líquido de Guéguen (con azul cotton) se puede apreciar que las "proconidias" se tiñen intensamente de azul y que de este colorante se deposita más intensamente en los puntos de origen de los tabiques transversales, indicando su formación por un espesamiento anular de la membrana que pro-

gresa hacia el centro. Un poco más tarde, cuando se establece la diferenciación biológica entre célula fértil y abortiva, el colorante se deposita más intensamente, también, en todo el contorno de la primera, lo cual nos induce a pensar que, tal vez, se forme una membrana propia en todo el contorno del esporo. En una oportunidad hemos sorprendido una formación protoplasmática desprendida en bloque del pedículo del filamento fértil (Fig. 1, N° 6), lo cual confirmaría los dos fenómenos morfológicos descritos, de particular interés: 1) la formación de una "proconidia" y su tabicamiento posterior delimitando los esporos, y 2) la formación de una membrana propia en todo el contorno de los mismos. Si realmente este fenómeno tiene lugar, la membrana del esporo se fusiona muy sólidamente con la del filamento fértil, a tal punto que, en los cultivos adultos, se observan numerosos esporos libres por ruptura de la membrana del filamento fértil en los puntos correspondientes a las células abortivas. El esporo tiene, en este momento, una forma rectangular con sus bordes ligeramente salientes, con el aspecto de toneletes, de 4 x 3,50 m.

#### SIGNIFICADO DE LA FRUCTIFICACIÓN DEL COCCIDIODES IMMITIS

Los esporos que el *C. immitis* forma en las hifas del micelio aéreo, en los cultivos, no son artrosporos, puesto que éstos se liberan por "clivaje" de los tabiques transversales, tampoco son "conidia vera", dado que, en el concepto de Vuillemin, estos esporos se separan en seguida del vértice de un canidióforo generalmente afilado. Mason, E. W.<sup>(6)</sup> ha profundizado estos estudios morfológicos y, en su concepto, las conidias típicas se forman, generalmente, por sucesión basípeta en el vértice de un canidióforo afilado (fialide), que es un punto abierto en crecimiento (esporos fialomeristémicos).

Los esporos del *C. immitis* son, pues, thallosporos, puesto que forman parte de la hifa que los lleva y, dado su mecanismo de formación, corresponden a los "Entosporados" de Vuillemin.<sup>(7)</sup> La liberación de estos entosporos tiene lugar por la ruptura de la membrana del filamento fértil a nivel de la célula abortiva que funciona, entonces, como un verdadero separador (*disjoncteur*, en francés, *disjunktor*, en alemán).<sup>(8)</sup>

Estos entosporos parecen formarse también en las hifas del micelio rampante o sumergido, pero en número reducido e irregularmente. Aun en el micelio aéreo fértil el proceso no se cumple invariablemente con la regularidad que hemos descrito, pues se ven en ocasiones dos entosporos adheridos, o la formación de un tabique que divide una célula abortiva, pero estas anomalías, di-

gamos, no quitan valor a nuestro juicio, al mecanismo de entosporulación.

Finalmente diremos que estos entosporos recuerdan a los formados por el género *Malbranchea* (Saccardo)<sup>(9-10-11)</sup>, y que según su mecanismo de diseminación corresponden al grupo de los esporos secos (dry-spores) de Mason. Los restos de la célula vacía (separador) que coronan ambos polos del espora facilita su diseminación y permanencia en el aire (esporos anemófilos).

Germinación de los entosporos: En cámara húmeda y en el medio líquido de Stanford, mencionado más arriba, los esporos germinan al cabo de cinco días de incubación a 37°C. Su diámetro aumenta hasta 5,85  $\mu$  y emite, sucesivamente, hasta 4 tubos germinativos.

Si sembramos en medio sólido de Stanford en caja de Petri dividida en 8 sectores, mediante una serie correspondiente de estrías y cortamos un bloque de agar cada 24 horas para examinarlo, depositando en la parte fértil un cubre objeto y montando en el líquido de Guéguen, podemos apreciar que la germinación de esporos tiene lugar a las 24 horas. En repetidas oportunidades hemos notado la separación, en el momento de germinar, de la membrana propia del entospora de la del filamento fértil. La emisión de tubos germinativos se opera tanto lateralmente como por sus extremos.

#### RESUMEN

El *Coccidioides immitis* forma, en los medios sólidos de cultivo, un micelio vegetativo y otro de fructificación. El primero es aéreo, superficial o rampante y sumergido o profundo. El micelio de fructificación se forma como ramas fértiles del micelio aéreo.

El micelio vegetativo es poco tabicado y de un diámetro muy irregular oscilando de 1,40  $\mu$  a 5  $\mu$ , y se presenta en ocasiones acintado. Ofrece las siguientes formaciones especiales: clamidosporos intercalares o terminales de un diámetro medio de 15  $\mu$ , micelio en raqueta, apresorios, funiculos, anastomosis vegetativas y esclerotes rudimentarios de 1 a 2 mm. de diámetro.

El micelio de fructificación comienza con la delimitación de una "proconidia" simple o ramificada que deja, en ocasiones, un pedicelo de longitud variable a modo de esporóforo. La "proconidia" se tabica en sentido basípeto originando una serie de células rectangulares que se diferencian en célula fértil y otra estéril o abortiva. La célula apical es siempre fértil. La célula fértil es un entospora que mide término medio 4 x 3,50  $\mu$ , y queda libre por la ruptura de las paredes de la hifa a nivel de las células abortivas que funcionan como separadores.

## RÉSUMÉ

Le *Coccidioides immitis* forme dans les cultures en milieux solides un mycélium végétatif et un mycélium de fructification ou reproducteur. On peut différencier dans le premier: a) un mycélium aérien, b) un mycélium superficiel ou rampant, et c) un mycélium immergé ou profond. Le mycélium de fructification naît du mycélium aérien.

Le mycélium végétatif est peu cloisonné et d'un diamètre très irrégulier de 1,4 à 5,  $\mu$ . Il est parfois rubané. On peut reconnaître les formations végétatives suivantes: chlamydozoospores terminales ou intercalaires d'un diamètre moyen de 15  $\mu$ ; mycélium en raquette; appressorium, funiculus, des anastomoses végétatives et des sclérotites rudimentaires de 1-2 mm. de diamètre. Le mycélium reproducteur consiste dans la délimitation d'une "proconidie" simple ou ramifiée de 3,5  $\mu$  de diamètre, laissant parfois un pédicule d'une longueur variable à la façon de sporophore. La proconidie se cloisonne en direction basipète aboutissant à la formation d'une série régulière de cellules rectangulaires dont l'une est fertile et la suivante stérile ou abortive. La cellule apicale est toujours fertile. Les cellules fertiles sont des entozoospores (thallospores) de 4,5 x 3,5  $\mu$  en moyenne, et ils restent libres par la rupture du filament fertile au niveau des cellules abortives qui fonctionnent comme des disjoncteurs.

## SUMMARY

*Coccidioides immitis* develops on solid culture media a vegetative and a fertile mycelium. The first one may be aerial (superficial or prostrate) and immersed or profound. The fertile mycelium is formed as branches of aerial mycelium.

The vegetative mycelium is branched and sparsely septated and of irregular thickness, varying from 1,40 to 5 micra. It is occasionally ribbon-like, and it shows the following special formations: chlamydozoospores (intercalary or terminal) of an average diameter of 15 micra, racket mycelium, appressoria, funicula, vegetative anastomosis and rudimentary sclerotia of 1 to 2 mm. in diameter.

Fertile mycelium begins with the demarcation of a single or branched "proconidia" which occasionally bear a pedicle or sporophore-like formation. Proconidia divide then basipetally leading to the formation of a row of cells one of which is fertile and the following sterile or abortive. Apical cells are always fertile. Fertile cells are "entozoospores" (thallospores) of an average diameter of 4,5 x 3,5 micra and are liberated by the rupture of the hyphal walls at the place of empty cells which function as disjunctors.



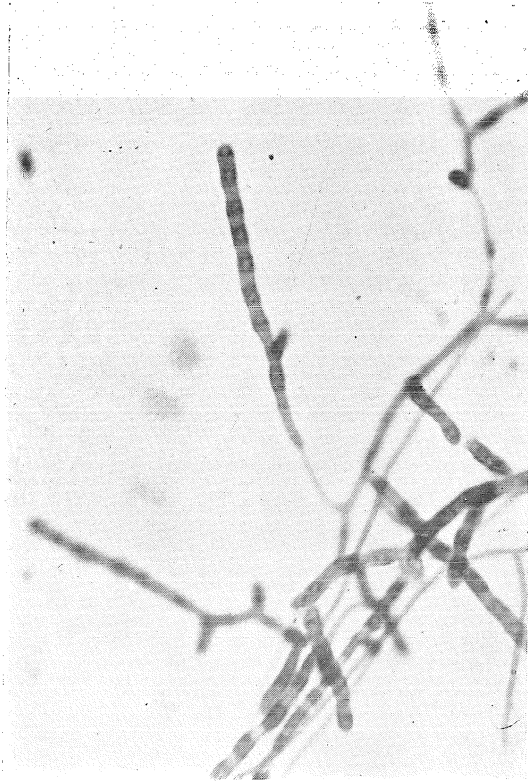


FIG. 3. — Proconidia ramificada del *C. immitis* con la formación de "entospores".

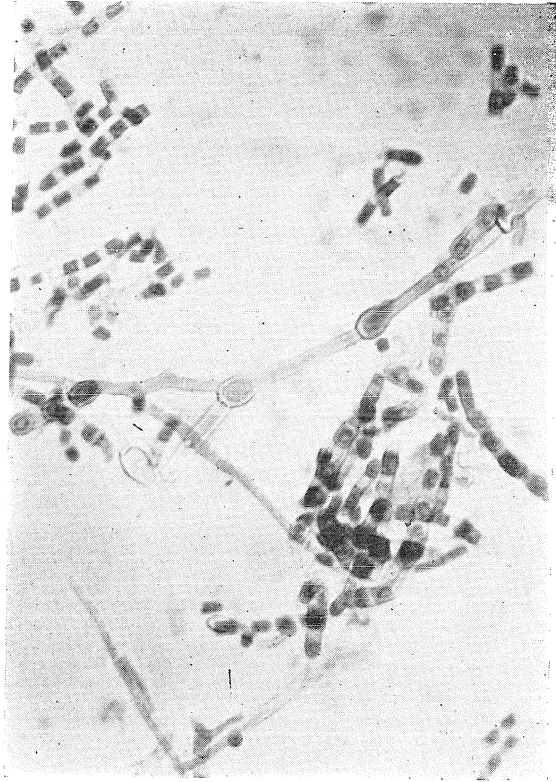


FIG. 4. — Micelio en raqueta y "entosporos" maduros con separadores (células vacías) del *C. immitis*.

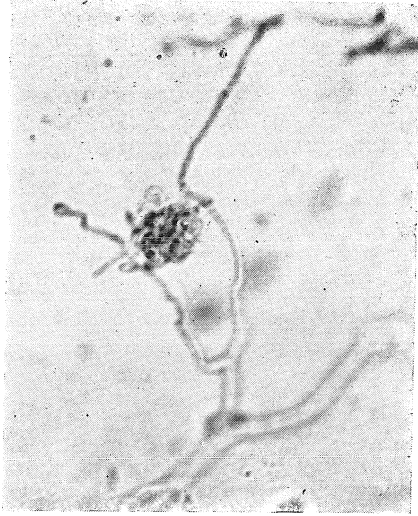


FIG. 5. — *Primordium* sinfiogeno del *C. immitis* en la formación de esclerotes.

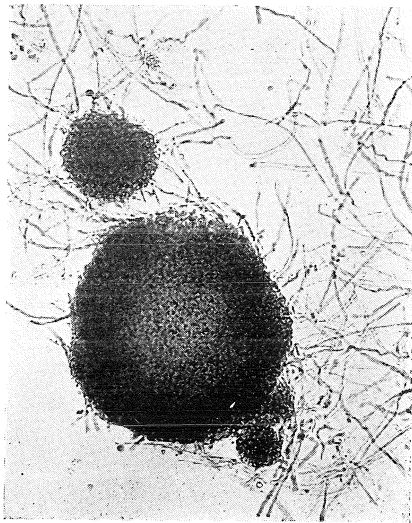


FIG. 6. — Esclerotes rudimentarios que tienden a fusionarse.



## BIBLIOGRAFÍA

- (1) NEGRONI, P. y RADICE, J. C.: *Rev. Arg. Dermatosisif.*, 1946, 30, 219.
- (2) NEGRONI, P. y RADICE, J. C.: *Sobre la formación de endosporos en Pseudococcidioides y Coccidioides*. En prensa.
- (3) CIFERRI, R. e REDAELLI, P.: *Boll. Sez. Ital. Soc. Internaz. Microbiol.*, 1934, 4, 2.
- (4) NEGRONI, P. y VILLAPAÑE LASTRA, T.: *Mycopathología*, 1939-40, 2, 52.
- (5) SKINNER, C. E., EMMONS, C. W. and TSUCHIYA, H. M.: *Henrici's Molds, Yeasts and Actinomycetes*. John Wiley & Sons, Inc., N. York, 1947.
- (6) MASON, H. W.: Annotated account of fungi received at the Imperial Micological Institute. List. 11, Kew Surrey, 1933 (fase. 2).
- (7) VUILLEMIN, F.: *Les Champignons parasites et les mycoses de l'homme*. P. Lechevalier & Fils, París, 1931.
- (8) NEGRONI, P.: Morfología y biología de los hongos. *El Ateneo*, Buenos Aires, 1938.
- (9) VACCARI, E., BALDACCI, E. e CIFERRI, R.: *Mycopathología*, 1939-40, 2, 43.
- (10) DODGE, C. W.: *Medical Mycology*. St. Louis. The C. V. Mosby Co., 1935.
- (11) REDAELLI, P. e CIFERRI, R.: Le granulomatosi fungine, etc. *In trattato de Micopatologia umana*, vol. 5, 1942. S. E. S. Firenze.
- (12) AINSWORTH, G. C. and BISBY, G. R.: *A dictionary of the fungi*. The Imp. Myc. Institute, Kew, Surrey, 1943.