

Estudios sobre el *Coccidioides immitis* Rixford et Gilchrist

VIII. Estudio citológico

Por P. NEGRONI

Este trabajo representa uno de los aspectos del estudio de las cepas autóctonas de *Coccidioides immitis* que hemos emprendido desde hace un par de años y que nos permite ahora ampliar los datos aportados por Baker, Mrak y Smith ⁽¹⁾ y por Emmons. ⁽²⁾

Dividiremos este estudio en: a) Citología del hongo en los cultivos, y b) en la vida parasitaria, sea en las lesiones experimentales del cobayo o en las espontáneas del hombre; pues es sabido que en los medios comunes de cultivo el *C. immitis* presenta un aspecto microscópico diferente del que ofrece en los tejidos parasitados.

a) *Citología en los cultivos.* Para efectuar estas observaciones hemos utilizado, por regla general, el material de cultivos en medios sólidos, en el de Baker y Smith ⁽³⁾ que es un medio mineral con cloruro de amonio como fuente nitrogenada y glucosa o en agar caldo. Como ya lo hemos expuesto en trabajos anteriores ^(4 y 5), el desarrollo del micelio de fructificación aparece más precoz y exuberantemente en el primero, favoreciendo, en cambio, el agar caldo, el crecimiento vegetativo.

En algunas oportunidades hemos recurrido a los cultivos en los medios líquidos correspondientes a los sólidos ya mencionados. La técnica utilizada por Orskov en el estudio de los *Actinomyces* a la cual hemos introducido algunas variantes, nos ha proporcionado un buen material de estudio y nos ha permitido seguir gradualmente la evolución del hongo que nos ocupa.

Observaciones al estado fresco: Montando el material de cultivos jóvenes de 4 días de incubación a 25°C en solución fisiológica, nos ha permitido observar corrientes protoplasmáticas suaves, revelables especialmente por el desplazamiento de los corpúsculos grasos. También es posible apreciar ya el comienzo de fenómenos de migración protoplasmática de unos artículos a otros, los cuales se enriquecen en contenido celular, tanto en el micelio aéreo como en el del substrato. Estos fenómenos se acentúan en los cultivos más viejos,

pues a los 12 días hemos podido observar hifas con "entosporos" (en el sentido de Vuillemin) bien desarrollados, tanto en el micelio aéreo como en el sumergido, aunque más raramente en este último. Como ya lo hemos descripto en trabajos anteriores, los "entosporos" absorben todo el contenido celular de los artículos vecinos, de tal suerte, que entre ellos media, por regla general, una célula vacía que funciona como separador. Los "entosporos" se presentan refringentes y de aspecto uniforme y céreo. Las células vacías parecen tener un diámetro menor y reducidas exclusivamente a la membrana. La migración protoplasmática que acabamos de describir y que conduce a la formación de los "entosporos" se produce irregularmente en el micelio del substrato, observándose tubos vacíos al lado de otros llenos homogéneos, refringentes y de aspecto céreo. En ocasiones se produce el fenómeno de crecimiento perforante que ilustramos en la Fig. 1, nº 3, y en algunas cepas se asiste a la transformación de los entosporos en elementos globulosos y de mayor diámetro con el aspecto de clamidosporos con 1 ó 2 tabiques a veces, según aparece en la Fig. 1, nº 2. Estos elementos eran particularmente abundantes en la cepa nº 692 (estadounidense), llegaban a medir unos 7,5 μ germinando a menudo "in situ". Este hecho nos indica que los "entosporos" que hemos descripto son realmente "thallosporos", y que los elementos globulosos que acabamos de mencionar son, por lo menos en ocasiones, "entosporos" hinchados y en vías de germinación.

Coloraciones vitales. Hemos examinado material de cultivos de 24 y 30 horas de incubación a 28°C, montándolo en una *solución débil de rojo neutro*, comprobando que, cuando esta substancia se disuelve en el agua corriente o en la solución fisiológica, los "entosporos" y los tubos germinativos, presentan un contenido celular muy vacuolizado como si ejerciera un efecto tóxico. Las vacuolas son, en ocasiones, grandes y ocupan todo el diámetro celular. No se aprecian además, corpúsculos metacromáticos.

Montando el material de los cultivos en rojo neutro disuelto en caldo se observa que los "entosporos" en vías de germinación conservan su protoplasma granuloso casi homogéneo. Los corpúsculos metacromáticos se observan tanto en el espora como en el tubo germinativo. En el primero son pequeños y casi desprovistos de movimientos brownianos, en tanto que en el tubo germinativo se los observa dentro de vacuolas, son de mayor volumen y móviles. En los cultivos de 7 días el vacuoma tiene los mismos caracteres que en otros *Eumycetes*, vale decir, que la metacromatima se precipita en el interior de las vacuolas en forma de corpúsculos animados de movimientos brownianos, luego se fijan a la pared tomando el aspecto de casquetes o media luna, y finalmente, se redisuelven comunican-

do a la vacuola un tinte uniformemente rosado. Nunca hemos podido ver con nitidez la existencia de un vacuoma reticulado en la extremidad de los filamentos jóvenes.

Montando el material de los cultivos en *soluciones débiles de violeta Dahlia o de verde Janus*, hemos podido apreciar la existencia en los filamentos de cultivos jóvenes de 12 horas a 28°C de un condrioma filamentosos que sufre fácilmente la transformación vesiculosa. No hemos logrado visualizarlo, en cambio, en los cultivos de 12 días.

El material de cultivos de 12 horas montado en una *solución débil de rojo Ruthenium*, no presenta particularidad alguna. Por el contrario, los cultivos esporulados de 12 días presentan zonas de las paredes laterales y de los tabiques teñidos en rojo, lo cual acusaría la presencia de compuestos pécticos.

Coloraciones postvitales. Solución de Lugol: no permite apreciar la existencia de glucógeno en los esporos germinados (cultivos de 30 horas). Existe, en cambio, en forma de depósitos polares en los artículos de los filamentos en vías de esporulación de un cultivo de 4 días a 30°C (Fig. 1, n° 6). En los esporos bien desarrollados de un cultivo de 7 días, el glucógeno se presenta como manchas parduseas en los polos.

El *colorante de Guéguen* ⁽⁵⁾ tiñe uniformemente en azul el protoplasma de los tubos germinativos de los esporos (cultivos de 30 horas) no acusando la existencia de corpúsculos grasos. El material de los cultivos de 4 días a 25°C, montado en una gota de este colorante, ofrece las siguientes particularidades: la proconidia se tiñe uniformemente de azul más intensamente que el resto del filamento vegetativo apenas teñido. Luego, esta coloración es más acentuada en los puntos nodales de los tabiques, al propio tiempo que, comenzando desde el vértice, se observan artículos alternativamente más teñidos y con pequeños corpúsculos rojos (grasa). En los días siguientes se asiste a la formación definitiva de los "entosporos" a expensas de las células intermedias que quedan desprovistas de contenido celular y no se tiñen. Los esporos maduros presentan gruesos glóbulos de grasa formados por fusión de los pequeños y sus paredes más intensamente teñidas en azul, colorante que casi no toma la membrana de las células vacías. Frecuentemente, la cantidad de grasa dentro de los esporos es tan considerable, que éstos se presentan uniformemente rojos.

Observando material de un cultivo de 5 días en el medio sólido mineral, hemos comprobado, frecuentemente, en el interior de las ampollas de los filamentos en raqueta, la presencia de elementos flexuosos teñidos en azul con la morfología del condrioma filamentosos, pero cuya interpretación es para nosotros, oscura.

Las preparaciones montadas en *Sudan III láctico* y en una *solución de ácido ósmico al 2%*, ofrecen el mismo aspecto y distribución de los corpúsculos grasos que en el material teñido mediante el colorante de Guéguen.

COLORACIONES CON LA HEMATOXILINA FÉRRICA DE HEIDENHAIN

Para evitar todo manipuleo que pudiera alterar la arquitectura celular, hemos cortado sectores de cultivos en medios sólidos distribuidos en cajas de Petri sumergiéndolos en el baño fijador durante 24 horas. *Solución de ácido ósmico al 2% - 5 ml.*

Para evitar todo manipuleo que pudiera alterar la arquitectura celular, hemos cortado sectores de cultivos en medios sólidos distribuidos en cajas de Petri sumergiéndolos en el baño fijador durante 24 horas.

Como puede apreciarse en la figura n° 8, los artículos contienen habitualmente varios núcleos provistos de una membrana bien definida, de un nucleolo excéntrico y, en ocasiones, es posible reconocer la existencia de una fina red de cromatina. Los "entosporos" contienen siempre, según nuestra experiencia un solo núcleo. A veces nos ha sido posible asistir a la división nuclear en el interior de los filamentos vegetativos que se opera por división directa, no cariocinética.

Cuando empleamos el fijador compuesto de ácido crómico y ácido ósmico ⁽⁶⁾ hemos podido comprobar que, tanto los filamentos vegetativos como los "entosporos", contienen una condrioma filamentosos que no difiere del de otros *Eumycetes*.⁽⁷⁾

b) *Citología en la vida parasitaria.*

En las *observaciones al estado fresco* del material montado en *solución fisiológica* hemos podido observar los diferentes aspectos ya conocidos del parásito con su membrana refringente. Los elementos jóvenes tienen un protoplasma homogéneo y corpúsculos brillantes (glóbulos de grasa) en su interior; los adultos endosporos poliédricos o quísticos.

Las *coloraciones vitales* con rojo neutro, rojo Ruthenium, verde Janus y violeta Dahlia no nos ha permitido apreciar particularidad alguna del parásito. Tenemos la impresión de que los colorantes acuosos no logran atravesar la membrana de los parásitos, pues no se revela en ellos corpúsculos metacromáticos ni otras estructuras citoplasmáticas que hemos descrito anteriormente. Además la membrana no se tiñe con el rojo Ruthenium así como tampoco las formaciones radiadas o claviformes que posee en ocasiones.

Con la *solución de Lugol* tampoco hemos podido apreciar, en forma nítida, la presencia de glucógeno.

El colorante de Guéguen tiñe en azul a veces muy intensamente la membrana de los parásitos y en rojo los glóbulos de grasa que contienen en su interior. Los elementos muy jóvenes tienen uno o varios corpúsculos grasos pequeños, en los mayores la reserva grasas, por regla general, abundante y los glóbulos confluyen a veces en una masa única (fase quística).

El material tomado de las lesiones experimentales del cobayo montado en el Sudan III láctico o en una solución de ácido ósmico al 2 por ciento permite apreciar, igualmente, la existencia de las reservas grasas.

COLORACIONES CON LA HEMATOXILINA FÉRRICA DE HEIDENHAIN

Hemos procedido con el material extraído de las lesiones en la misma forma que para el de los cultivos, es decir, fijándolo unas veces en la mezcla de Bouin y otras en la de ácido crómico y ácido ósmico.

Esta técnica de coloración nos ha revelado que la membrana del parásito así como las formaciones radiadas o claviformes que en ocasiones posee, son siderófilas (Fig. 2) y que los endosporos una vez formados poseen un solo núcleo pequeño, vesiculoso con cariolinfa y un nucleolo excéntrico. Como puede apreciarse en la figura 3 queda en ocasiones una banda de protoplasma fértil en la periferia del esporangio, estando ocupada la parte central por una gran vacuola o espacio hueco. Las figuras 2 y 4, revelan, al parecer, los fenómenos descritos por Ciferri y Redaelli como de copulación, pero no nos ha sido posible observar los correspondientes fenómenos nucleares. Además en la figura 4 puede apreciarse que los dos elementos unidos se han transformado en esporangios, lo cual es un hecho biológicamente poco probable si fuera realmente una copulación.

Finalmente hemos podido observar lo que ya hemos descrito en otro trabajo⁽⁸⁾, la emisión de los esporos por un poro u ostiolo por el cual se introducen luego polinucleares y mononucleares que rellenan la cavidad del esporangio.

En ocasiones hemos creído ver fenómenos de división nuclear en el interior de esporangios jóvenes, en la fase de protosporos. La sustancia cromática del núcleo se dispone en dos polos opuestos recordando al aspecto que adquieren los núcleos que se dividen por promitosis. Repetimos que los endosporos jóvenes poliédricos o quísticos (con membrana gruesa) están provistos de un solo núcleo, pero como estos últimos continúan a veces creciendo dentro del esporangio hemos observado formas que llegan a tener cuatro a ocho núcleos.

En las preparaciones teñidas con hematoxilina eosina, hemos podido apreciar los diversos aspectos que asume las formaciones

radiadas y claviformes descritas por Almeida.⁽⁹⁾ Se las observa más frecuentemente en los parásitos adultos y en los esporangios con endosporos quísticos, raramente en aquellos con endosporos poliédricos. Repetidas veces hemos visto restos de esporangios en forma de casquetes conteniendo numerosos endosporos quísticos cubiertos de formaciones claviformes en el segmento libre. Estas formaciones son acidófilas y no siempre se presentan en estrías o elementos claviformes radialmente dispuestos, pues hemos visto elementos jóvenes y otros adultos rodeados de una areola acidófila más o menos espesa, superando a veces el diámetro del parásito. La membrana de los endosporos quísticos en los esporangios abiertos es también, en ocasiones, fuertemente acidófila, todo lo cual hace pensar que se trata de formaciones de la misma naturaleza, dispuestas a veces en forma de manto y otras de elementos radiados.

RESUMEN

El estudio citológico del *Coccidioides immitis* en los cultivos nos ha permitido revelar la presencia de un vacuoma, condrioma, reservas de glucógeno y grasas como en otros *Eumycetes*.

Las reservas grasas migran hacia los entosporos acumulándose, primero, en los polos y luego son tan abundantes que ocupan casi totalmente su interior. El rojo Ruthenium acusa la existencia de zonas rojas en las paredes laterales y tabiques en los elementos de los cultivos de doce días. Los artículos del micelio vegetativo contienen varios núcleos que se dividen por amitosis en tanto que los entosporos contienen un solo núcleo. El condrioma es filamentososo.

Los colorantes acuosos no revelan en la fase parasitaria detalle citológico alguno del parásito. El colorante de Guéguen tiñe en azul claro el protoplasma del parásito así como su membrana que se presenta, aparentemente, más intensamente teñida. Las reservas grasas en forma de granulaciones finas o de gruesos glóbulos se tiñen en rojo.

La coloración con la hematoxilina férrica de Heindenhain permite apreciar que los endosporos tienen un solo núcleo y que las formaciones radiadas de la membrana son parcialmente siderófilas. Estas formaciones son acidófilas en las coloraciones con hematoxilina eosina.

RÉSUMÉ

L'étude cytologique du *Coccidioides immitis* dans les cultures nous a révélé les formations suivantes: vacuome, réserves de glycogène et graisses et un chondriosome filamenteux. La coloration vitale avec le rouge de Ruthénium nous a montré des zones rouges

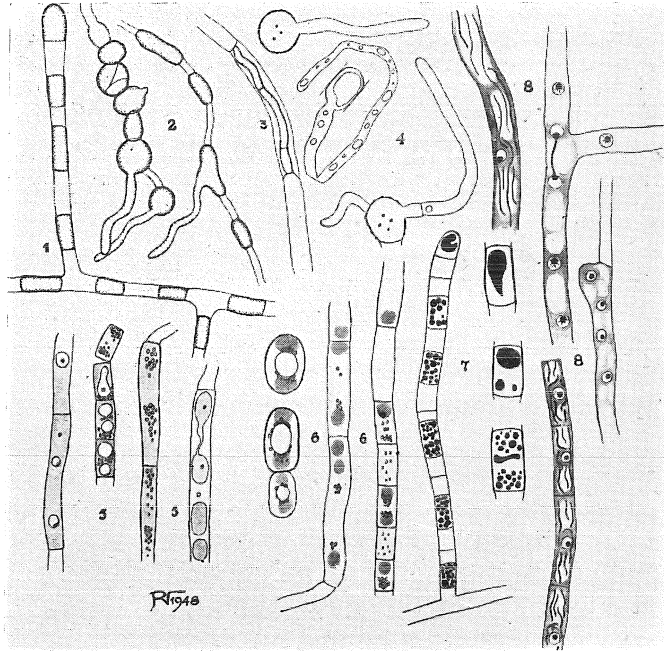


FIG. 1. — Aspecto citológico del *C. immitis* en los cultivos. 1 y 2: "entosporos". 3: crecimiento perforante. 4 y 5: vacuoma. 6: glucógeno. 7: grasas. 8: núcleos y condrioma.

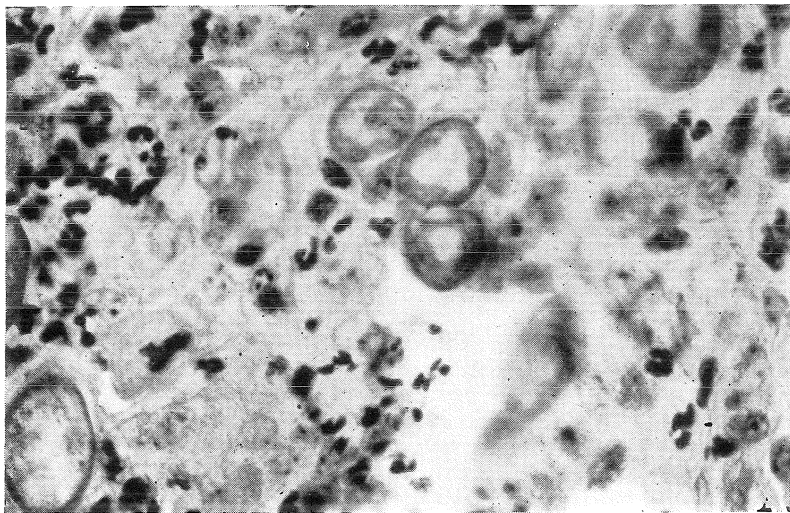


FIG. 2. — Elementos en aparente copulación.

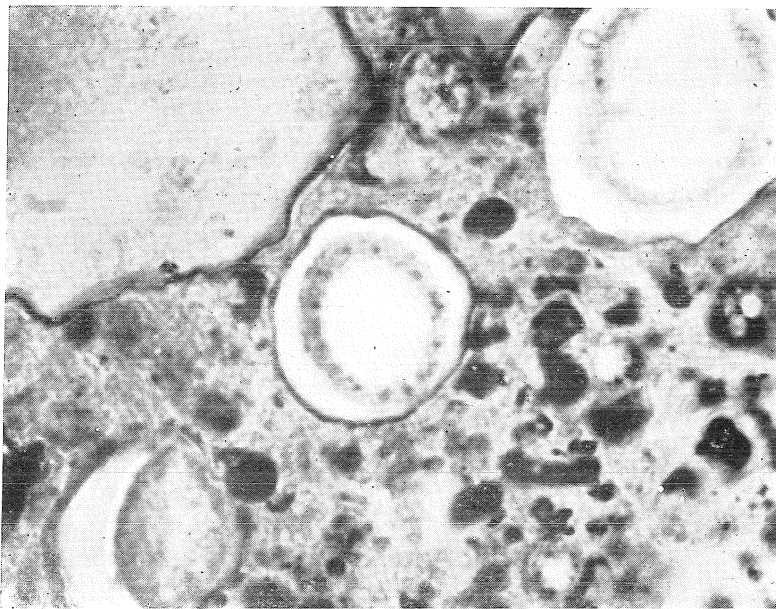


FIG. 3. — Núcleos en esporangios jóvenes.

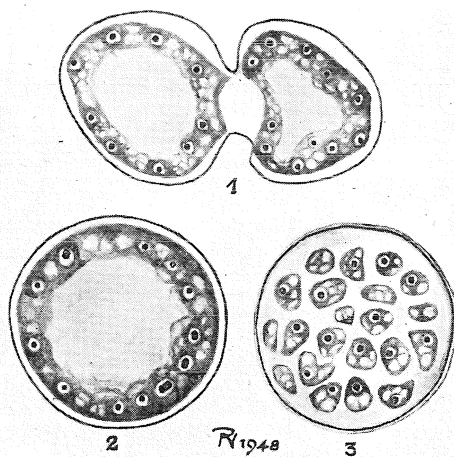


FIG. 4. — Núcleos en esporangios jóvenes y maduro. Los endosporos poliédricos son uninucleados.

dans les parois latérales et les cloisons du mycélium. Le contenu cellulaire, particulièrement la graisse, émigre dans les "entospores" qui prennent uniformément le Sudan III quand ils sont complètement développés. Les articles du mycélium végétatif ont plusieurs noyaux qui semblent se diviser par amitose. Chaque "entospore" a un seul noyau.

La membrane du *C. immitis* dans la fase parasitaire semble opposer une barriere à la pénétration des colorants aqueux. Les préparations montées avec le colorant de Guéguen montrent la graisse colorée en rouge et la membrane en bleu plus ou moins foncé. Les endospores ont un seul noyau. Les formations radiées ou claviformes sont acidophiles et partiellement syderophiles.

SUMMARY

Coccidioides immitis in culutures shows like other *Eumycetes* the following cytological particularities: vacuolar material, glycogen, fats and a thread-like chondriosome. Lateral walls and septa of the mycelium show red spots with the intra-vitam stain Ruthénium red. Cell content, specially fat, migrates into the "entospores" so when they are mature they stain uniformly red with Sudan III. Articles of the vegetative mycelium have several nuclei which divide by amitosis. The "entospores" have only one nucleus each.

In the parasitic phase the membrane of this fungus seems to offer a barrier to aqueous dyes. The fats stain red and the membrane more or less deep blue with Guéguen stain. Endospores have only one nucleus. Radiate or club-like formations are acidophilic and partially syderophilic.

BIBLIOGRAFIA

- (1) BAKER, E. E., MRAK, E. M. and SMITH, C. E.: *Parlowia*, 1943, 1 (2), 199.
- (2) EMMONS, C. W.: Biology of *Coccidioides immitis*. in *Biology of pathogenic fungi*. Waltham, Mass., U. S. A. the Chronica Botanica Co., 1947.
- (3) BAKER, E. E. and SMITH, C. E.: *J. Inf. Dis.*, 1942, 70, 51.
- (4) NEGRONI, P.: *Rev. Arg. Dermatosisif.*, 1948, 32, 50.
- (5) NEGRONI, P.: *Rev. Arg. Dermatosisif.*, 1948, 32, 58.
- (6) NEGRONI, P.: Morfología y biología de los hongos. Técnica micológica. *El Ateneo*, Buenos Aires, 1938.
- (7) GUILLIERMOND, A.: *Traité de cytologie végétale*. Paris, Le François, 1933.
- (8) NEGRONI, P. y RADICE, J. C.: *Rev. Arg. Dermatosisif.*, 1947, 31, 573.
- (9) ALMEIDA, F. P.: *Ann. Fac. Med. Sao Paulo*, 1934, 10, 29.