Formación de endosporos en el Coccidioides immitis observado con la luz de Wood.

Su posición sistemática

por P. Negroni y J. C. Radice

En un trabajo anterior (1) publicamos el resultado de nuestras observaciones efectuadas con la luz Wood de prepaciones microscópicas de las lesiones experimentales de Cavias inoculados con material de un cultivo clasificado erróneamente como *Trichosporon proteolyticum*. Este hongo forma en las lesiones células con endosporos por un proceso que coincide con el descripto por O da Fonseca (2) para el *Pseudococcidioides Mazzai*.

En este trabajo nos hemos propuesto comprobar si el *Coccidioides immitis* forma sus endosporos también por un proceso similar, utilizando para tal fin la misma técnica fluorescente que ha sido ya publicada por uno de nosotros (3).

MATERIAL

Cavias inoculados por diferentes vías con las siguientes cepas de *Coccidioides immitis* que se conservan en nuestra Micoteca del Instituto Bacteriológico "Dr. Carlos G. Malbrán":

Cepa Nº 691 procedente de Chicago (cepa Miss Church) U.S.A.

Cepa Nº 692 aislada por el Dr. Gillman de un vacuno. Wáshington, U.S.A.

Cepa Nº 695 aislada en Buenos Aires de un caso humano.

Cepa Nº 696 enviada por el Dr. Conant. Duke Univ., Nº 819. U.S.S.

Cepa Nº 696, 1; 696, 2; 696, 3 y 4 enviadas por el Dr. Conant con los Nos. 794, 800, 798, y 799 respectivamente. U.S.A.

Cepa Nº 694 procedente de Chicago (Dr. Ota). U.S.A.

Cavias Nº 45 y 221 inoculados con la cepa Nº 691, vía peritoneal e intratesticular.

Presentado en la reunión de comunicaciones del 7 de octubre de 1947.

Cavias Nº 95 y 204 inoculados con la cepa 695 Nº 692 por vía peritoneal e intratesticular.

Cavias Nº 49 y 90 inoculados con la cepa 695 por vía peritoneal y testicular.

Cavias Nº 25 y 273 inoculados con la cepa 696 por vía peritoneal y testicular.

Cavias Nº 87 y 212 inoculados con la cepa 696,1 por vía peritoneal y testicular.

Cavias Nº 12 y 13 inoculados con la cepa 696,2 por vía peritoneal y testicular.

Cavias Nº 3 y 47 inoculados con la cepa 696,3 por vía peritoneal y testicular.

Cavias Nº 217 y 256 inoculados con la cepa 696,4 por vía peritoneal y testicular.

Cavias Nº 80 y 100 inoculados con la cepa 696 por vía peritoneal y testicular.

Se sacrificó un Cavia de cada lote al cabo de 10 días y el otro al cabo de 1 mes. Los órganos con lesiones fueron fijados en formol al 10 %, incluídos en parafina y cortados con el micrótomo. Con fines comparativos efectuados sistemáticamente, además de las coloraciones fluorescentes, otras con las técnicas comunes: hematoxilina eosina y hematoxilina férrica de Heidenhain.

RESULTADOS

En todos los casos hemos podido comprobar que el parásito adulto forma endosporos por "clivaje" sucesivo de su contenido celular. La presencia de una gran vacuola central y la formación de endosporos en una banda periférica de protoplasma, aun cuando se observa en todos los casos no es sin embargo un proceso de endosporulación exclusivo ni predominante. El clivaje mencionado tiene lugar mediante la aparición de vacuolas planas que dividen el contenido celular en masas poliédricas, identificadas por O. da Fonseca como protosporos, los cuales se subdividen por el mismo mecanismo en elementos más pequeños que son los esporos definitivos. Estos tienen, al comienzo una membrana fina y son poliédricos por presión recíproca y, finalmente, aumentan de volumen, se redondean y su membrana se espesa y torna refrigente. Este proceso de maduración se opera dentro o fuera de la célula madre (esporangio). No hemos podido apreciar en ningún caso la presencia de protoplasma residual o epiplasma.

La maduración de los esporos no es simultánea, puesto que con cierta frecuencia se observan elementos en diferentes estados evolutivos y de variado tamaño dentro de la célula madre. En una ocasión observamos una célula adulta en su estado inicial de la fructificación, presentando un solo plano de clivaje que dividía a su contenido celular en dos porciones aproximadamente iguales.

Finalmente, hemos comprobado en algunas oportunidades la

fusión de los esporos maduros, fenómeno que tiene lugar dentro o fuera del esporangio. Las células que se fusionan tienen el mismo tamaño o son apenas desiguales. En nuestras observaciones estos elementos medían alrededor de 5 μ. diámetro.

La mayoría de estas observaciones habían sido ya efectuadas por Posadas (4), el descubridor de este parásito. Transcribimos a continuación su descripción del proceso de endosporulación: "No todas las zoosporas tienen el mismo tamaño ni están en el mismo grado de evolución en el interior del quiste. Hay macroesporas y microosporas: hay zoosporas que se han transformado en quistes, mientras otras están en los primeros grados de evolución". Este sabio describió como fases evolutivas diferentes correspondiendo a estados clínicos también diferentes la proliferación infectante o invasora del parásito observada en los monos inoculados experimentalmente que se opondría a la proliferación enquistada o vegetativa.

En la fig. 3, p. 211 y 240 (Obras Completas de Alejandro Posadas) se puede apreciar formas de la proliferación infectante con una vacuola central. En las ilustraciones que acompañan al trabajo de Rixford y Gilchrist (5) también se observan aspectos semejantes.

Fonseca fué el primero en llamar la atención sobre el mecanismo de formación de los endosporos que dió como característico del *Pseudococcidioides*, proceso que fué extendido al *Coccidioides immitis* por Almeida en 1932 (6) al considerar morfológicamente idénticos a estos dos microorganismos.

Nuestros estudios efectuados con la técnica fluorescente, confirman, ampliamente, los hechos observados por Almeida.

POSICIÓN SISTEMÁTICA

Las opiniones de los autores que se han ocupado del *Coccidioides immitis* se encuentran divididas en dos tendencias, respecto a su posición sistemática. Ophüls (1905); McNeal y Taylor (1914); Takahashi (1933); Stewar y Kimura (1940) y Fonseca (1928 y 1943) sostuvieron o sostienen que el *C. immitis* forma ascos con ascosporos. Particularmente interesante es la opinión de O. da Fonseca quien considera a la fructificación de este hongo similar a la de otros representantes de la familia *Protomycetaceae*. Esta familia perteneciente a los *Hemiascomycetes* contiene a los géneros *Protomyces* y *Taphrina* que forman endosporos en una capa periférica de protoplasma.

En contraposición a los autores mencionados, Hartmann (1912); Redaelli y Ciferri (1936) y Baker y Mrak (1941) creen que la fructificación de este hongo es un esporangio y lo colocan entre los *Phycomycetes*.

Analizaremos sucesivamente los caracteres de la formación de endosporos en los *Ascomycetes* y en los *Phycomycetes* para poder, luego, interpretar el mecanismo de endosporulación del *C. immitis* y emitir nuestra opinión sobre su posición sistemática.

O. Brefeld (1891) dividió a los *Ascomycetes* en *Exoasci* y *Carpoasci* según que los ascos nacieran libremente del micelio o estuvieran encerrados en un fruto.

Reconoció, además, la existencia de hongos de micelio ramificado cuya fructificación participaba de los caracteres del esporangio de los *Phycomycetes* de un tamaño variable y conteniendo un número también variable de endosporos. Esta fructificación no era la típica de los *Ascomycetes* con un número definido de endosporos. A este grupo intermedio pertenece el género *Ascoidea* relacionado con los *Exoasci*, el género *Theleobolus* del tipo *Carpoasci* y el género *Protomyces* con clamidosporos. A estas formas intermedias las colocó en el grupo de *Hemiasci*.

Harper en 1899 demostró que el proceso típico de endosporulación de los *Phycomycetes* que forman esparangios consiste en la división de su contenido celular por "clivaje"; en cambio los ascosporos, nacen por formación celular libre en el interior de los ascos que es la fructificación típica de los *Ascomycetes*.

Juel en 1921 definió a los *Hemiascomycetes* como aquellos *Mycomycetes* primitivos vecinos de los *Phycomycetes* en los cuales la fructificación nace directamente sobre el micelio. Según Juel el esporangio es, desde el comienzo, multinucleado en tanto que el asco contiene al principio un par de núcleos y forman finalmente 8 ó pocos endosporos.

Los estudios de Brefeld, Dangeard, Popta, y Varitchak han demostrado, entre otros, que en *Ascoidea*, *Protomyces* y *Taphrinum* los endosporos se originan por formación celular libre quedando en el asco protoplasma residual o epiplasma.

Un hecho que conviene recordar es la copulación que tiene lugar entre los endosporos de *Protomyces* después de su liberación.

Numerosos investigadores después de los estudios de Brefeld (Oltmanns, Phuret, Strasburger, Berhold, y Rother) reconocieron que la división del contenido celular del esporangio de los *Phycomycetes* tiene lugar, como en las Algas, mediante la aparición de surcos en la periferia o desde vacuolas situadas en el interior del plasma esporangial.

C. A. Schwarze (1922) comprobó que en el Mucor mucedo el plasma esporangial se divide por clivaje en bloques poliédricos, los cuales se subdividen por el mismo proceso en los esporos iniciales groseramente poliédricos. Esta subdivisión se acompaña de una contracción de las células, seguida de un estado de expansión

L. B. Walker (1923) estudiando la formación de endosporos en *Endogone malleola*. Hark, verificó que este hongo tiene hifas tabicadas, que su esporangio carece de columela y que los surcos de clivaje comienzan cerca de la periferia de esta fructificación y progresan hacia el interior quedando dividido su contenido celular en masas poliédricas de diferentes formas y tamaños. Estas masas se subdividen para formar los esporos definitivos que son siempre multinucleados.

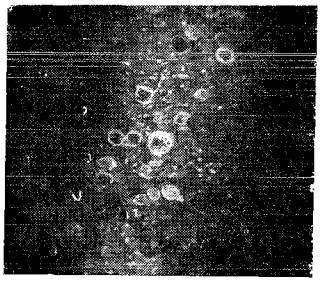

Fig. 1. — Elementos del **C. immitis** en los tejidos vistos con luz fluorescente (obj. 16 mm., oc. 15 x., c. 12 cm.).

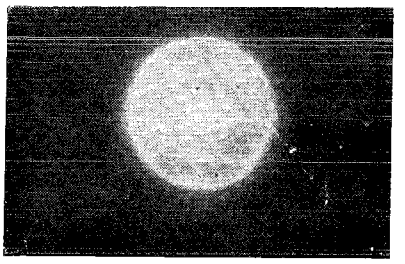

Fig. 2. — Elemento de **C. immitis** en vías de esporular, examinado con luz fluorescente, (obj. inmersión 1/12).

Fig. 3. — El mismo elemento de **C. immitis** visto a mayor aumento, (obj. 1/12, 1,8 mm. oc. per. 15 x., cámara Makan).

La división del contenido celular por clivaje formando masas poliédricas fué señalada en el parásito que nos ocupa por Fonseca, Almeida, Ciferri y Redaelli y por Baker y Mrak. Estos últimos investigadores (12-13) lograron también la formación de la fructificación in vitro.

Por lo expuesto sumariamente consideramos a la fructificación del *Coccidioides immitis como* esporangio, reforzando con nuestras observaciones los conceptos ya emitidos por Redaelli y Ciferri, que son los sigiuentes: a) la fructificación de *C. immitis* contiene un elevado número de endosporos y no un número múltiplo de 2. b) las células jóvenes contienen un solo núcleo y las maduras numerosos núcleos originados por mitosis sucesivas. c) carece de protoplasma residual o epiplasma. d) los endosporos se diferencian por clivaje sucesivo del contenido celular, del parásito adulto, e) los esporos sufren, frecuentemente, dentro del esporangio una expansión (aumento de volumen) y se rodean de una membrana gruesa.

Si el *C. immitis* debe colocarse en la familia *Coccidioidaceae* como lo han hecho los autores italianos o en la familia *Endogonaceae* de los Zygomytes, es una cuestión que las investigaciones futuras resolverán. En ambos grupos existen hongos con micelio filamentoso tabicado (*Catenaria anguillulae* en los Chytridiales y *Endogone malleola* en los *Zygomycetes*), sin embargo la copulación de los esporos hablaría en favor de su vinculación a los *Chytridiales*.

RESUME

En observant à la lumière de Wood les préparations microscopiques tratitées par des fluorochromes, des organes de cobayes inoculés avec des souches argentines et nordaméricaines de *Coccidioides immitis*, nous avons pu vérifier avec une particulière netteté le mécanisme de formation des endospores déjàs décrit par Fonseca, Almeida, Redaelli et Ciferri, Baker et Mrak, etc.

Les endospores naissent après un clivaje successif du contenu cellulaire du parasite adulte qui s' opere parfois dans une couche périphérique du protoplasme. Il ne reste pas d' epiplasme.

Les tcheniques spéciales de coloration nous ont permis de constater que le spore a un seule noyau. Nous avons observé aussi des phénomènes de copulation entre les endospores ou les cellules jeunes libres.

Nous croyons avec Almeida que le genre *Pseudococciodioides* doit tomber en synonimie. Le *C. immitis* doit être classé parmi les *Phycomycetes*.

SUMMARY

The fluorescent microscopy of the preparations obtained from experimental coccidioidomycosis of the guinea pigs inocculated with argentine and northamerican strains have allowed us to ascertain

with particular clarity the formative mechanism of endospores in this fungus, confirming the descrptions given by Fonseca, Almeida, Redaelli and Ciferri, Baker and Mrak, etc.

The endospores are born through succesive clivages of the cellular content of the adult parasite which takes occasionally in a peripheric layer of protoplasma. We have been unable to make sure of the existence of residual plasma or epiplasma.

Owing to special staining techniques we have been able to ascertain that the spore has only one nucleus. We have also observed copulation phenomena among spores or young free cells. We agree with Almeida that the genus *Pseudococcidioides* which presents in parasitic life, the same morphological characteristics as the *Coccidioides* should become synonimus with it. In our opinion *C. immitis* should be classified among the *Phycomycetes.*

BIBLIOGRAFÍA

1. NEGRONI P. y RADICE J. C. — Rev. Arg. Dermatosif., 1946. 30, 219.
2. FONSECA O. R. DA. — Cuarta Reunión Soc. Arg. Pat. Reg. Norte, 1928, 495.
3. RADICE J. C. y NEGRONI P. — Asoc. Med. Hosp. P. Piñero. Set. 18, 1946.
4. POSADAS A. — Obras completas. B. Aires, Imprenta de la Univ., 1928.
5. RIXFORD E. — And Gilchrist, T. C. Amer. Med. Assoc., mayo 1895.
6. AIMEIDA F. — Ann. Fac. Med. Sao Paulo, 1932, **7**, 11.
7. OPHULS W. J. — Exp. Med., 1901-1905, **6**, 443.
8. MCNEAL y TAYLOR R. M. — J. of Med. Res., 1914, **30**, 261.
9. MOORE M. — Missouri Bot. Garden, 1932, 19, **19**, 397.
10. STEWART R. A. y KIMURA F. J. — Inf. Dis., 1940, **66**, 212.
11. FONSECA O. R. — Parasotologia Médica. Tomo I. Guanabara, Río, 1943.
12. REDAELLI P. y CIFERRI R. — Boll. Sez Ital. Soc. Internaz. Microbiol., 1943, fasc. VII-VII,3.
13. BAKER E. E. y MRAK E. M. — Amer. J. Trop. Med., 1941, **21**, 589.
14. BREFELD O. — Untersuchungen aus den Gesammtgebiete der Mykologie. IX Die Hemiasci und die Ascomyceten. Munster, 1891.
15. DANGEARD P. A. — Le Botaniste, 1903, 1ère. Ser., 59.
16. VARITCHAK B. — Contribution a l' étude du développement des Ascomycetes. Thèses, Fac. Sciences, París, 1931.
17. GAUMANN E. A. y DODGE C. W. — Comparative morphology of fungi. Mc.Graw-Hill Bock Co. Inc. New York, 1928.
18. FITZPATRICK H. M. — The Lower fungi Phycomycetes. McGraw-Hill Book Co. Inc. New York, 1930.
19. DODGE C. W. — Medical Mycology. St. Louis. The C. V. Mosky Co., 1935.
20. SCHWARZE C. A. — Mycologia, 1922, **14**, 143.
21. WALKER L. B. — Mycologia, 1923, **15**, 245.