ESTUDIOS SOBRE EL *COCCIDIOIDES IMMITIS* RIXFORD ET GILCHRIST: IX. CICLO EVOLUTIVO

Por P. NEGRONI

En este trabajo nos hemos propuesto seguir paso a paso la marcha de la infección experimental del cobayo con el objeto de establecer el ciclo evolutivo del parásito que nos ocupa.

1ª *Serie de experiencias.*— Inoculamos por la vía testicular 16 cobayos machos de 400 g. de peso con una suspensión de "entosporos" de un cultivo de la cepa Nº 696, sacrificándolos periódicamente y anotando las lesiones macroscópicas y el aspecto microcópico del parásito.

2ª *Serie de experiencias.*— Se inocularon por la vía intramuscular con una suspensión le "entosporas" de un cultivo de la cepa Nº 696 un lote de 16 cobayos de 350-400 g. reinoculándolos a los 2, 4, 6, 9, 12, 15, 18 y 21 días por la vía testicular.

El estudio de las lesiones y del aspecto microscópico del parásito se efectuó, como en las experiencias anteriores, al estado fresco y en los cortes teñidos por la hematoxilina eosina. Los cobayos fueron sacrificados a los 3 y a los 9 días.

RESULTADO

En el testículo de los cobayos reinoculados a las 48 hs. y sacrificados 3 días más tarde, todos los "entosporos" se han transformado en parásitos de infección, caracterizados por su gran volúmen, pues llegan a medir hasta 98 μ de diámetro con una gran laguna central y conteniendo, frecuentemente, protoplasma residual. La membrana peridial es tan delgada que, al adherirse a los protosporos, adquiere un aspecto reticulado (fig. 1). Los endosporos granulosos o poliédricos se forman en una banda periférica de protoplasma fértil de unas 17μ de espesor

Presentado para publicar el 3 de mayo de 1949.

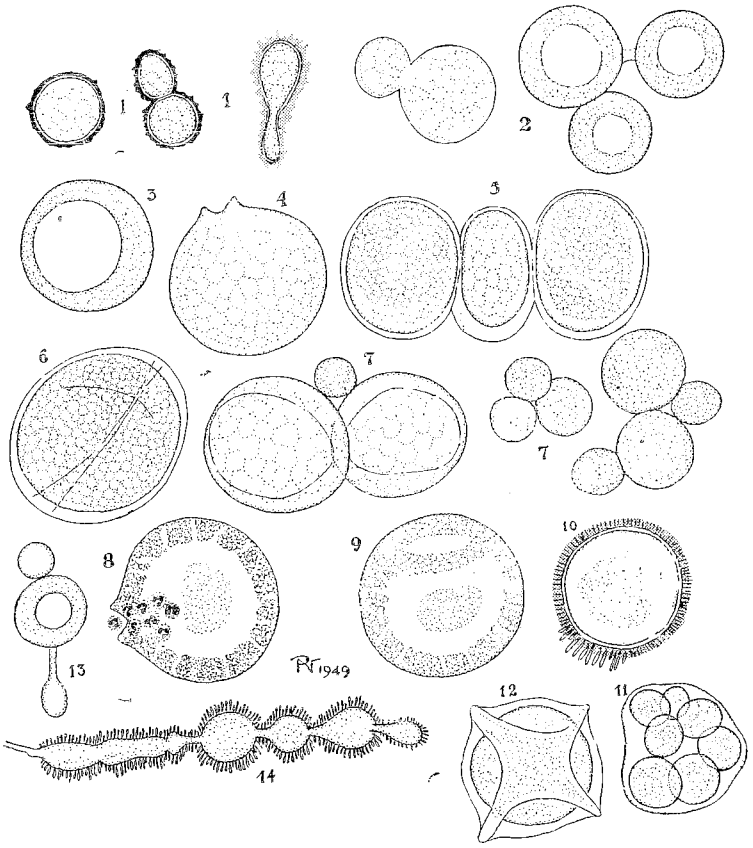

Fig. 1 Diversos aspectos microscópicos tomados con la cámara clara del *Coccidioides immitis* en la infección experimental del cobayo 1: de testículo al cabo de 24 horas de la inoculación. 2 y 3: id (cobayo 691) al cabo de 48 horas. 4: id (cobayo 693) al cabo de 4 días. 5 y 6: íd. al cabo de 6 días de la inoculación intratesticular. 7: grupo de endosporos (cobayo 699) en el material tomado al cabo de 11 días de la inoculación. 8 y 9: esporangios con protosporos al cabo de 5 días de la inoculación (cobayo R 27). 10: parásito quístico (cobayo 674) con areola acidófila y formaciones radiadas en la membrana. 11: esporangiolo quístico, 12: parásito quístico con membrana gruesa y plegada. 14 y 15: material de cultivo reinoculado al cabo de 6 dias de la primera inoculación (se enquista y no evoluciona).

y se liberan a través de un poro u ostiolo de 6 a 7μ de diámetro. Los esporangios vacios son invadidos por leucocitos.

El testículo de los cobayos reinoculados a los 4 días y sacrificados 3 días más tarde, se presenta gríseo y algo necrótico. Los exámenes microscópicos permiten apreciar que los esporangios de infección son de menor volúmen y existen algunos parásitos quísticos jóvenes con formaciones radiadas en su membrana. Se comprueba que los pará-

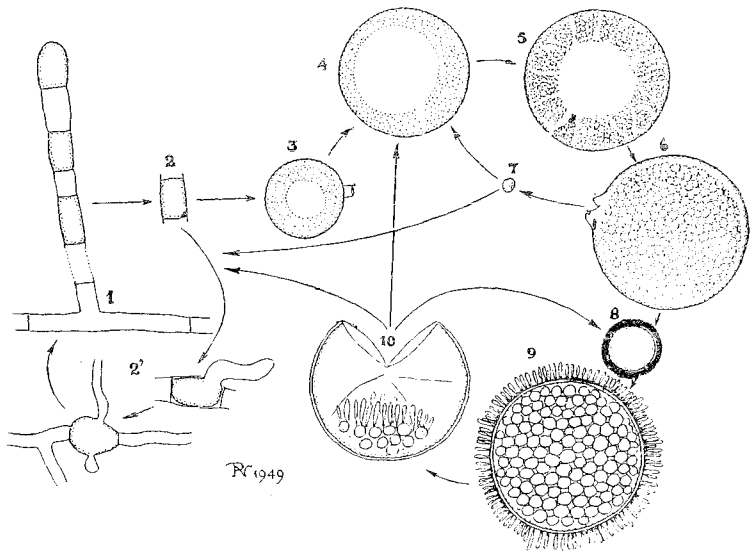

Fig. 2: Ciclo evolutivo del *Coccidioides immitis*. 1 y 2: en los cultivos: formación de la proconidia, de los "entosporos" y germinación de los mismos, cerrando el ciclo en la vida sapro fítica. 3 a 10: ciclo en la vida parasitaria (cobayo y probablemente hombre). 3: parásito joven con restos de los separadores (disjunctor). 4: parásito con protoplasma fértil en la periferia. 5: esporangio de infección. 6: esporangio en una fase intermedia. 7: endosporo ameboide o granuloso. 8: parásito quístico joven con formación radiada en la membrana. 9: esporangio quístico con formaciones radiadas. 10: esporangio quístico dehiscente cuyos endosporos están rodeados de formaciones radiadas.

sitos están en diversos estados evolutivos; que los esporangios presentan una membrana gruesa y carecen, a veces, de laguna central. En el testículo de los cobayos sacrificados 8 días más tarde, se comprueba que dominan los parásitos quísticos jóvenes y adultos (esporangios) que llegan a medir 60,5 μ, con areola y formaciones radiadas acidófilas y, a veces, con 8 a 10 endosporos de diversos tamaños (esporangiolos quísticos).

La regresión de los esporangios de infección a expensas de los quísticos, se acentúa en las lesiones de los cobayos reinocoulados con más de 4 días de intervalo y se ven aparecer esporangios cuyos endosporos tienen caracteres intermedios entre los granulosos o polédricos de membrana muy fina y los quísticos con membrana bien diferenciada. El proceso de retardo evolutivo y enquistamiento se observa, también, en el material inoculado; los "entosporos" y trozos de micelio no evolucionan y su membrana se cubre de formaciones radiadas acidófilas. Este fenómeno que obser-

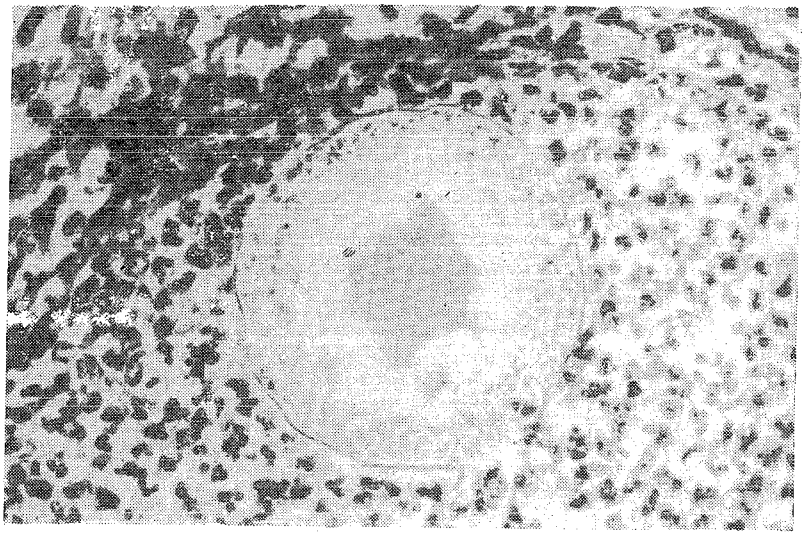

Fig. 3. Esporangio en la fase infectante con protoplasma residual.

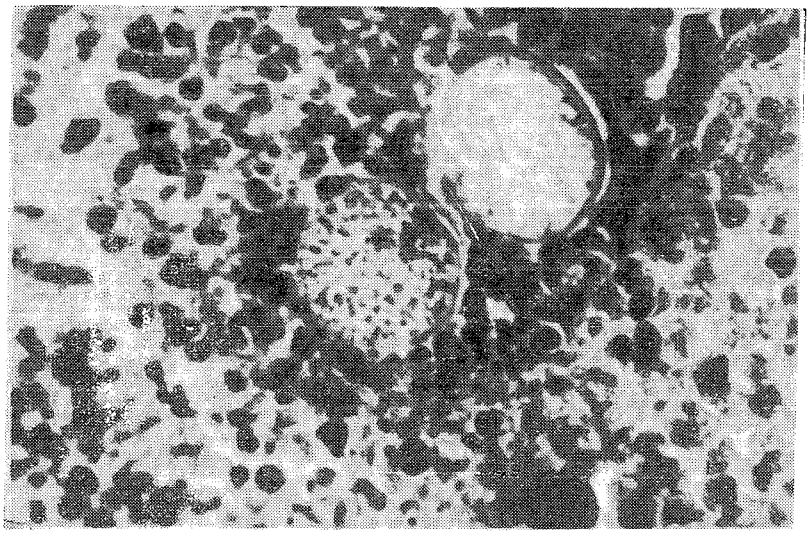

Fig. 4. Dos esporangios en la fase infectante, vecinos, en diverso grado de evolución; simulando formas de copulación.

COBAYOS TESTIGOS: Una inoculación por la vía testicular y *sacrificarlos a los 3 días:* Reac. escrotal, testículo aumentado de vol., gris violáceo (algo necrótico); ganglios inguinales congestionados. Parásitos: Abundantes, todos son esporangios de infección, la mayoría con laguna central, algunos con ostiolo hasta 72 μ de Φ.

A. COBAYOS REINOCULADOS: 1ª Inoc. intramuscular; 2ª inoc. intratest. efectuada a los:

2 DIAS	4 DIAS Idem	6 DIAS Id. necrótico	9 DIAS Idem	12 DIAS	15 DIAS	18 DIAS	21 DIAS
Reac. escrotal, test. algo necrótico, ganglios ing. cong. Parásitos: abundantes, espor. infec. hasta 98 μ mebr. fina con ostiolo, lag. central. Abundantes polinucleares.	Diversos estados evolutivos, esporangios infec. hasta 46,1 μ. Quiste joven con formaciones radiadas.	Id. esporangios hasta 58 μ Espor. vacío con f. radiadas. Parásitos quísticos. Esporangios intermedios.	Parásitos: reg. cantidad. dominan los esp. de inf. con lag. central o llenos, hasta 52 μ. Quistes hasta 40,2 μ. Mater. inoc. enquistado y con f. r.	Reac. escrotal ausente. Test. con zonas hemorrágicas. Reg. cantidad, la mayoría q. Esporangios de inf. llenos hasta 36 μ. Quistes desde 5,8 μ. hasta 35 μ *con o sin* f. r. Células giagntes presentes.	Test. no adherido a la vag. gríseo y resistente. Dominan los parásitos q. hasta 34,5 μ. Esporangios de inf. llenos 15 μ y espor. intermedios Células gigantes presentes	Reacción escrotal. Test. aumentado de vol. y consistencia. Parásitos: escasos. Esporangios de infec. llenos hasta 30 μ. Parásitos quísticos con f. r., jóvenes y esporangios hasta 32 μ.	Id. No adherido a la vaginal. Ganglios sublumbares e ing. infartados. No se ven esporangios. Escasos quistes con o cin f. c., desde 8,5 μ hasta 32 μ. Abundantes c. gigantes con parásitos.

COBAYOS TESTIGOS: Una inoculación intratesticular y *sacrificados a los 9 días:* Reacción escrotal. Test. adherido a la vaginal, polo anterior fibroso, necrótico el resto. Ganglios inguinales y sublumbares de mayor vol., miliar pulmonar. Abundantes esporangios de infec. con laguna central hasta 63,5 μ, algunos parásitos quísticos jóvenes o adultos con formaciones radiadas.

B. COBAYOS REINOCULADOS: 1ª Inoc. intramuscular; 2ª inoc. intrates. efectuada a los:

2 DIAS	4 DIAS	6 DIAS Id. destículo no adherido Idem	9 DIAS	12 DIAS Reac. escrotal, test. adherido a la vaginal, resistente. Idem	15 DIAS Reac. escrotal moderada. Test. adherido a vaginal con zonas hemorrágicas. Fibroide.	18 DIAS Test. adherido a la vaginal, caseoso. Ganglios ing. y subl. infartados.	21 DIAS Test. adherido a la vaginal cascoso. Ganglios ing. y sublumbares aumentados de volumen.
Aproximadamente el mismo aspecto macro y microscópico que en el testigo. Espor. infec. hasta 75 μ.	Reac. escrotal. Test. adherido a la vag. fibroso en polos. Ganglios ing. y subl. de mayor vol., nódulos en bazo y pulmones Parásitos abundantes, la mayoría quísticos. Esporangios quísticos hasta 58 μ, spor. de infec. llenos hasta 29 μ esopr. intermedio hasta 64 μ con formac. radiadas. Escasas cel. gigantes. Esporangiolo q. de de 60,5 μ.	Reg. cantidad, la mayoría q. desde 5,2 μ a 43,5μ con o sin f. r., esporangios de infec. llenos hasta 20,2 μ. Esporangios quísticos. Células gigantes presentes.	Test. en cav. abdominal, gríseo y resistente. Ganglios sublumbares aumentados de volumen. Parásitos: Reg. cantidad de parásitos q. desde 4,5 μ hasta 34,5 μ. Espor. intermedios. Tinción irregular de alg. parásitos. Células gigantes presentes.	La mayoría son parásitos q. con f. r. y englobados en c. gigantes. Espor. q. hasta 32 μ. Parásitos escasos. raros esporangios, tinción irreg. mat. inoculado enquistado.	Escasos. Quísticos desde 5,8 hasta 29 μ con o sin f. r. Esporangios de infec. 14,5 μ llenos. Mat. inoculado enquistado. Células gigantes abundantes.	Regular cant. de parásitos, la mayoría quísticos y con f. r. hasta 28,5 μ. Esporangio de infec. lleno de 30 μ. Células gigantes abundantes.	Reg. cantidad de parásitos, la mayoría quísticos de diversos tamaños y con f. r., esporangio quístico con f. r. de 29 μ, esporangio de inf. lllenos de 32 μ. Cél: gigantes abundantes.

Explicación de las abreviaturas: vol.: volumen; f. r.: formaciones radiadas; vag.: vaginal; ing.: inguinales; subl.: sublumbares; esp.: esporangios; q.: quísticos; inf.: infección; mat.: material; inoc.: inoculado, inoculación.

A.: Lote de cobayos sacrificados 3 días después de la reinoculación.

B.: Lote de cobayos sacrificados 9 días después de la reinoculación.

vamos por primera vez en los cobayos reinoculados a los 6 días y sacrificados 9 días más tarde se ha mantenido, luego, en las renoculaciones posteriores separadas de la primoinfección por un lapso mayor.

En los cobayos reinoculados después de 15 días de la primoinfección los parásitos son cada vez más ecasos, casi todos quísticos, de tamaño reducido tasta 34,56 μ de diámetro y carentes, con frecuencia, de endosporos.

RESUMEN

El *Coccidioides immitis* tiene en las condiciones y medios comunes de cultivo una sola fase evolutiva consistente en la formación de "entosporos" que germinan y reproducen el micelio original cuando son trasplantados a un medio nuevo (2).

En el organismo animal se observa, en cambio, un polimorfismo evolutivo condicionado por el estado de alergia y de inmunidad. En la primoinfección los "entosporos" se hinchan y transforman en esporangios de infección, se caracterizan por el monoformismo evolutivo y por su abundancia. Los esporangios llegan a medir 98 μ de diámetro, su membrana es fina y, al adaptarse a los protosporos, adquieren un aspecto reticulado; tienen una gran vacuola central y los endosporos granulosos o poliédricos con membrana muy fina, se forman en una banda periférica de protoplasma fértil de unos 15-17 μ de espesor, con o sin fase previa de protosporos. Se observa con frecuencia, protoplasma residual y la dehiscencia se opera por un ostiolo de 6-7 μ de diámetro.

Hacia el 6º día la membrana peridial aumenta de espesor y comienzan a presentarse parásitos quísticos jóvenes de 8 a 11 μ con o sin formaciones radiadas acidófilas en su membrana.

Hacia el 7º día se observan parásitos de infección, sin laguna central y otros cuyos endosporos tienen ya una membrana evidente (formas intermedias entre los esporangios de primoinfección y los quísticos). Los esporangios quísticos que miden ahora 86,5 μ se reducen en número y volumen en los días subsiguientes, alcanzando un diámetro máximo de 37,5 μ o menor aún. Concomitantemente el número de endosporos se reduce (esporangios con 3 a 10 endosporos) y pueden aún desaparecer. En el curso de la segunda semana de la infección el parásito presenta un

polimorfismo evolutivo y de fase debido a que la inmunidad ejerce una acción específica sobre el desarrollo del *C. immitis*, produciendo el retardo en su evolución y su enquistamiento. El retardo evolutivo se manifiesta por los siguientes fenómenos: a) parásitos de distintas edades, b) desaparición del protoplasma residual llenando los esdosporos toda la cavidad de esporangio y c) endosporos de diversos tamaños. El enquistamiento se traduce por: a) un mayor espesor de la membrana que se cubre, también, de una areola o de formaciones radiadas acidófilas, b) los endosporos adquieren un mayor volumen y una membrana propia, c) los esporangios reducen su volumen y el número de endosporos, d) el material de cultivo reinoculado se enquista sin evolucionar y e) aumento de las reservas de grasas.

En las lesiones de reinoculación o en las metastáticas, los esporangios de infección desaparecen casi totalmente hacia el final de la segunda semana para ser reemplazados por los parásitos quísticos.

Las pretendidas formas de copulación no son, según nuestra experiencia, sino "entosporos' del material inoculado o endosporos de los esporangios, vecinos y simplemente adheridos por su membrana.

SUMMARY

Coccidioides immitis shows in common culture conditions only one evolutive phase consisting in the formation of "entospores" (thallospores). In the animal body (guinea-pigs) it shows a polymorphic evolution conditioned by the acquired resistance of the host. Forty eight hours after the first inoculation, "entospores" are transformed in "primo-infection" sporangia which reach 98 μ in diameter and are characterized by its thin peridial membrane, by its fertil peripherical protoplasme which forms protospores and later sporagiospores, and its central residual protoplasme. Dehiscence takes place through an ostiole of 6-7 μ in diameter, and the empty sporangia are invaded by white blood cells (infective phase of Posadas).

Acquired resistance produces the fungistasis and probably the destruction of the parasites by giant cells. The inhibition is characterized by the delay of the evolution and the encystment of the parasite. The first phenomenon is revealed by: a) desappearence of the central lagoon and resi-

dual protoplasme, b) reduction of the volume of the sporangia, c) evolutionary polymorphisme (parasites of different ages). Encystment is characterized by: a) thickness of peridium which is often provided of radiated acidophylic formations, b) young cystic parasites and cystic sporangia without residual protoplasm (cystic phase of Posadas), c) encystment of reinoculated culture material and d) increase in fat reserves.

Between the twoo polar forms (primo-infection and cystic sporangia), which balance is stablished during the second week, there are all the transitional forms. Reinoculation produces an early and accelerated reaction.

The so-called copulation forms are only neighbour parasites adhering by their membranes.

RESUMÉ

Le *Coccidioides immitis* présent dans les conditions communes des cultures une phase évolutive simple consistant dans la formation d' entospores (thallospores). Dans l'organisme animal (cobaye) on observe, au contraire, un polymorphisme évolutif conditionné par l' état immunoalergique. Dans la primo-infection les "entospores" se transforment au bout de 48 heures en sporanges qui atteignent 98 μ de diamètre avec une membrane peridiale très mince, une bande périphérique de protoplasme fertile ou naissent les sporangiospores par la divison de protospores, et du protoplasme residuel au centre. La déhiscence s'opère par un ostiole de 6-7 μ de diamètre et le sporange vide est envahi par des leucocytes (phase infectant de Posadas).

Les réactions immunitaires inhibent le développement du parasite et conduisent, probablement, á leur destruction par des cellules géantes. Les phenomènes d'inhibition se traduisent par le retard évolutif et l' enkystement. Le premier consiste en a) disparition de la lacune centrale et du protoplasme residuel, b) reduction de volume du sporange, c) polymorphisme évolutif (parasites de diffirents ages). L' enkystement se traduit par: a) épaissisement de la membrane péridiale et formations radiaires acidophyles, b) apparition de kystes jeunes et des sporanges kystiques dépourvus, toujours, de protoplasme residuel (phase kystique de Posadas).

Entre les deux formes polaires (de primo-infection et

kystique), dont l' equilibre s' stablit vers la deuxième semaine, il-y-a toutes les formes intermediaires. Plus tard les sporanges kystiques prennent la place des sporanges d'infection et souffrent le mème retard evolutif avec formation d'esporangioles, c) le materiel de culture reinoculé s'enkyste aussi et d) les reserves grasses augmentent. La reinoculation se traduit par une réaction precoce et accelerée.

Lse pretendues formes de copulation sont, en réalité, des parasites voisins adherés.

BIBLIOGRAFÍA

1) NEGRONI, P. y RADICE, J. C. — *Rev. Arg. Dermatosif.*, 1947, *31*, 573.
2) NEGRONI, P. — *Rev. Arg. Dermatosif.*, 1948, *32*, 1.
3) NEGRONI, P. — *Rev. Arg. Dermatosif.*, 1948, *32*, 9.
4) NEGRONI, P. — *Rev. Arg. Dermatosif.*, 1948, *32*, 219.
5) NEGRONI, P. y VIVOLI, D. — *Rev. Arg. Dermatosif.*, 1948, *32*, 239.
6) NEGRONI, P., DAGLIO, C. A. N. y BRIZ DE NEGRONI, C. — *Rev. Arg. Dermatosif.*, 1948, *32*, 250.
7) NEGRONI, P y BRIZ DE NEGRONI, C. — *Rev. Arg. Dermatosif.*, 1948, *32*, 264.