

Cromoblastomycosis Experimental en Bufo marinus*

por

A. Trejos**

(Recibido para su publicación el 5 de mayo de 1953)

En 1910 observa CARINI (5) en Sao Paulo, al efectuar la autopsia de ranas (*Leptodactylus pentadactylus*), nódulos fibrosos en los pulmones y riñones, y dentro de los mismos encuentra filamentos micelianos y células fumagoides de color pardo, con gruesas membranas.

Posteriormente y también en Sao Paulo, ALMEIDA (3) repite el hallazgo de Carini y llama la atención hacia la semejanza que hay entre las formas parásitas del hongo observado por ese autor y las que se encuentran en los tejidos humanos parasitados por agentes de la cromoblastomycosis (1).

En ninguna de estas oportunidades se obtuvo cultivo del hongo en cuestión, pero luego ALMEIDA (2), tratando de reproducir la enfermedad en animales, inoculó ranas (*Leptodactylus pentadactylus*), observando, en una que murió 10 días después de inoculada con *Phialophora verrucosa*, numerosas lesiones distribuidas en diversos órganos y en las cuales pudo encontrar los parásitos de color pardo característico bajo la forma de hifas y células arredondadas.

Que sepamos, además de Almeida, los únicos investigadores que han usado como animales de experiencia anfibios en estudios sobre la cromoblastomycosis, son AREA LEAO, MELLO & CURY (4), que inocularon *Leptodactylus ocellatus* por vía intraperitoneal con cultivos de *Phialophora pedrosoi* (*Fonsecaea pedrosoi*). La mayoría de las ranas con que trabajaron estos autores murió muy poco tiempo después de la inoculación, pero en dos que pudieron examinar, y que murieron a los 57 días de inoculadas, encontraron nódulos localizados en el mesenterio, el hígado y la cara interna de la pared abdominal. El hongo se presentaba, en el interior de esos nódulos, bajo la forma filamentosa y de células arredondadas.

* Trabajo presentado al V Congreso Internacional de Microbiología efectuado en Río de Janeiro del 17 al 24 de agosto de 1950.

** Laboratorio Bacteriológico del Hospital San Juan de Dios.

En el curso de un estudio que estamos llevando a cabo sobre 21 cepas¹ de agentes de cromoblastomycosis aisladas por nosotros en Costa Rica, resolvimos inocular cultivos de *Fonsecaea pedrosoi* por vía subcutánea en sapos.

Las experiencias de los autores antes mencionados nos permitieron suponer que los agentes de la cromoblastomycosis tienen poder patógeno para los anfibios en general y de ahí que deseáramos determinar si producían lesiones en sapo, animal más resistente que las ranas y que nos permitiría, por lo tanto, una observación más prolongada. Escogimos además la vía subcutánea por ser menos traumatizante que la intraperitoneal y obtuvimos los resultados que pasamos a exponer.

MATERIAL Y METODOS

Se emplearon las cepas de *Fonsecaea pedrosoi* Cr. 1, Cr. 2, Cr. 3, Cr. 4, Cr. 5 y Cr. 7 de nuestra colección, aïladas entre agosto de 1948 y agosto de 1949 y mantenidas por resiembras en medio de Sabouraud glucosado, a la temperatura del Laboratorio.

Para hacer las suspensiones que serían inoculadas a los sapos, se usaron cultivos de 74 días de incubación a temperatura ambiente en medio de Sabouraud maltosado (Difco), excepto para la cepa Cr. 4, de la cual se usó un cultivo de la misma edad en Sabouraud glucosado. Tratando de retirar la menor cantidad posible de medio, se recogió el micelio de cada cultivo y se colocó en morteros para su trituración; una vez hecha ésta, se suspendió en 8 a 10 cm³ de solución de cloruro de sodio al 9 por mil, procurando que las suspensiones tuviesen aproximadamente la misma concentración.

Se guardaron luego en la refrigeradora hasta tener el resultado de las pruebas de esterilidad para bacterias, que se practicaron sembrando una gota de cada suspensión en caldo simple e incubando a 37° C.

Después de permanecer 48 horas en la refrigeradora se retiraron y con cada una de ellas se preparó una suspensión más diluida, agregando a 5 cm³ de solución salina fisiológica V a X gotas de la suspensión original, a fin de obtener concentraciones semejantes.

Se escogieron seis sapos machos adultos, de la especie *Bufo marinus*, abundante en los alrededores de San José, los cuales pesaban entre 180 y 250 gramos y se inocularon con 5 cm³ de sendas suspensiones por vía subcutánea en el saco linfático dorsal.

Con el fin de evitar el reflujo, se introdujo cada vez la aguja intramuscularmente en el muslo izquierdo y luego se llevó por debajo de la piel hasta alcanzar el saco linfático.

Los sapos se guardaron en recipientes individuales de vidrio que miden 20 por 20 por 20 cm, en el fondo de los cuales se colocó algodón mojado para mantener la humedad; estos algodones se cambiaron generalmente todos los días. Cada animal se designó con el número de la cepa que le fué inoculada.

¹ Actualmente contamos con 38.

RESULTADOS

Durante la primera semana se nota en todos los animales una reacción más o menos intensa en el saco linfático dorsal, reacción que se manifiesta por una elevación de la piel; que en esta región se muestra brillante.

En los días sucesivos esta reacción local varía en los diversos animales, siendo unas veces más intensa y otras apenas perceptible.

A los 20 días de inoculado, el sapo N^o 3 presenta dos pequeñas fístulas sobre el saco linfático, a través de las cuales sale un pus cremoso que al microscopio muestra gran cantidad de fragmentos de hifas de longitud variable; no encontramos células fumagoides semejantes a las que se observan en el hombre. Estas fístulas persistieron hasta la muerte que ocurrió entre la noche del trigésimo sétimo y la mañana del trigésimo nono día de inoculado.

Suponemos que la muerte del animal fuera debida a asfixia por el amoníaco desprendido de la orina del mismo; el olor de este gas se apreciaba perfectamente cuando nos aproximamos al frasco y, como pudimos comprobar luego, es sumamente tóxico para los sapos.

Al efectuar la autopsia se observa gran cantidad de nódulos subcutáneos redondos, adheridos a la piel del abdomen, de color amarillento y de tamaño variable entre fracciones de milímetro y 2 mm. de diámetro. Además existen otros nódulos de coloración negruzca y de localización cutánea; miden éstos aproximadamente 1 mm de diámetro.

En los órganos no percibimos modificaciones patológicas. Se encontraron algunos nemátodos (*Filariidæ*) en la cavidad general y tremátodos (*Cholodocystus intermedius*) en la vesícula biliar.

La fístula que se observaba en la piel comunicaba con el saco linfático dorsal, en el cual había un exudado gelatinoso y negruzco.

Se retiraron nódulos cutáneos y subcutáneos unos de los cuales fueron fijados en formol para su estudio posterior, y otros colocados en hidróxido de sodio o en lactofenol entre porta y cubreobjetos.

Después de 51 días de practicada la inoculación, muere el sapo N^o 5 por la misma razón que el N^o 3.

En la autopsia no se encuentran helmintos, ni modificaciones de los órganos internos, ni nódulos cutáneos oscuros semejantes a los observados en el sapo N^o 3; solamente aparecen tres nódulos subcutáneos amarillentos localizados bajo la piel del abdomen y adheridos a ésta; dos del lado izquierdo y uno del lado derecho (Plancha I, Figs. 1-2-3 y 4). Medían unos dos milímetros de diámetro, es decir, más grandes que la mayoría de los del sapo N^o 3. Dos de estos nódulos fueron fijados en formol al 10 por ciento y con el otro se hicieron preparaciones en NaOH y lactofenol para su estudio inmediato.

A los 68 días de inoculados, los cuatro animales que quedan se mantienen más o menos en las mismas condiciones a excepción del N^o 4 en el cual ya no se aprecia reacción alguna en el saco linfático dorsal. Se nota, sin embargo, que al lado izquierdo del abdomen hay tres nódulos cutáneos oscuros de más o menos 1 mm. de diámetro. Se retiró por biopsia uno de estos nódulos

para comprobar en él la presencia del hongo (ver más adelante). La herida de la biopsia se cierra pocos días después, dejando una cicatriz apenas perceptible. Este animal continúa aparentemente en las mismas condiciones hasta que fué sacrificado a los 113 días de la inoculación. La necropsia no muestra modificaciones apreciables de los órganos internos, ni helmintos. Se encuentra gran cantidad de nódulos subcutáneos amarillentos, los mayores de los cuales miden aproximadamente 1 mm, adheridos a la fase interna de la piel que cubre el abdomen. Hay también siete nódulos cutáneos oscuros, semejantes a los descritos en el sapo N° 3 (Plancha II, Figs. 1-2-3 y 4).

Los otros tres animales continúan en observación en el momento en que escribimos estas líneas.

ASPECTO DEL HONGO EN LAS LESIONES

En el punto de inoculación se observa el parásito con una forma similar a la que tenía en las suspensiones que fueron inyectadas; no obstante parece haber un espesamiento de las membranas y se encuentran algunas hifas con abultamientos que tienen el aspecto de clamidosporas (Plancha III, Figs. 1 y 2). Tanto las hifas como las clamidosporas, no tienen sus membranas tan pigmentadas como las células fumigoides que describiremos posteriormente en los nódulos cutáneos.

En los nódulos subcutáneos encontramos agrupamientos de hifas cortas o fragmentos de hifa ya con sus membranas más pigmentadas, pero sin que hubiesen tomado aún la forma arredondada (Plancha III, Figs. 3 y 4).

Es en los nódulos cutáneos donde vamos a encontrar el parásito únicamente bajo la forma de células fumigoides, indiferenciables de las que se observan en los tejidos humanos parasitados, y que como estas últimas, se dividen mediante septos (Plancha III, Figs. 5 a 10). La figura 7 de la Plancha III muestra, para comparación, células fumigoides de *F. pedrosoi* provenientes de un caso humano y fotografiadas en las mismas condiciones.

ASPECTO HISTOLOGICO DE LAS LESIONES

a) Nódulos subcutáneos: Estos nódulos están constituidos por células inflamatorias mononucleadas, muy escasas células gigantes (Plancha IV, Fig. 5) y detritos celulares; en derredor de ellos, y limitándolos a manera de una cápsula, hay varias capas concéntricas de tejido fibroso, semejantes a las descritas por CARINI (5), ALMEIDA (1-2-3) y AREA LEO, MELLO & CURY (4) en los animales por ellos estudiados (Plancha IV, Fig. 4).

El hongo se encuentra formando agrupamientos, distribuidos por todo el nódulo y con las características anteriormente descritas (Plancha III, Figs. 3 y 4; Pl. IV, Figs. 6 y 7).

b) Nódulos cutáneos: Son éstos los que muestran mayor interés, pues además de presentar una localización semejante a la de las lesiones cromoblastomicósicas humanas, tienen una estructura granulomatosa típica.

En derredor de un centro necrótico, aparecen las células inflamatorias mononucleadas, y a continuación, formando una corona, células gigantes y grupos de células fumagoides del parásito que se encuentran fuera o dentro de los gigantocitos (Plancha IV, Figs. 1, 2 y 3).

Algunos de los parásitos englobados por las células gigantes presentan sus membranas menos pigmentadas y están aparentemente en degeneración (Plancha IV, Fig. 2).

Limitando el granuloma, aparecen también varias capas de tejido fibroso (Plancha IV, Figs. 1 y 2).

La ausencia de leucocitos polimorfonucleares está de acuerdo con el pequeño número de ellos existe en la sangre de estos anuros, como pudimos comprobar al practicar, a otro sapo, un recuento diferencial que dió los siguientes resultados: células de aspecto linfocítico: 84,6 %; neutrófilos: 4 %; eosinófilos: 9,4 %; basófilos: 2 %.

Las células gigantes presentan, al igual que las células inflamatorias mononucleadas, núcleos pequeños, densos, semejantes a los de linfocitos; pareciera por lo tanto que se originan de estos últimos; su citoplasma es finamente vacuolado (Plancha IV, Fig. 2).

Queremos consignar aquí nuestro profundo agradecimiento a todos aquellos amigos que en una u otra forma han colaborado a la ejecución de este trabajo.

CONCLUSIONES

La *Fonsecaea pedrosoi* tiene poder patógeno para sapos de la especie *Bufo marinus* en los cuales determina, además de la reacción inflamatoria el en punto de inoculación, lesiones a distancia constituídas por nódulos subcutáneos y cutáneos. Estos últimos son particularmente interesantes por tener una estructura granulomatosa típica, rica en células gigantes y porque en ellos el parásito se presenta únicamente bajo la forma arredondada, con el mismo aspecto que toma en las lesiones humanas y el mismo método de reproducción.

El hecho de que los sapos sean poiquilotermos demuestra que la temperatura no influye directamente en el arredondamiento de los agentes de la cromoblastomicosis durante su fase parasitaria y que son otras las condiciones que lo determinan, estando probablemente ligadas al parasitismo intratisular o intracelular.

Nos proponemos por lo tanto llevar a cabo experiencias que contribuyan a conocer mejor los factores que determinan este arredondamiento, no sólo en los agentes de la cromoblastomicosis, sino también en los de otras granulomatosis de origen micósico, producidas por hongos filamentosos durante su vida saprófita.

RESUMEN

En vista de las observaciones de CARINI y de las experiencias de ALMEIDA y AREA LEO, MELLO & CURY, sobre la patogenicidad de los agentes etiológicos de la cromoblastomicosis, inyectados por vía intraperitoneal a los Anuros de las especies *Leptodactylus ocellatus* y *L. pentadactylus*, quisimos determinar el poder patógeno de la *Fonsecaea pedrosoi* para el *Bufo marinus*. Se inocularon seis ejemplares con suspensiones de cultivos de este hongo provenientes de seis casos humanos, empleando una cepa para cada animal.

En las autopsias practicadas se pudo observar, además de los nódulos subcutáneos semejantes a los descritos en *Leptodactylus* por los autores antes mencionados, nódulos cutáneos de constitución granulomatosa típica. Estos últimos contenían el hongo, no ya bajo la forma filamentososa, abundante en los primeros, sino exclusivamente bajo la forma arredondada, semejante en todos sus aspectos a la de las células fumagoides que se encuentran en los tejidos humanos lesionados.

Como los sapos son poiquiloterms, queda establecido que la temperatura no tiene influencia en el arredondamiento del talo de los agentes de la cromoblastomicosis durante su fase parasitaria, transformación ésta que es una modalidad de la reducción morfológica sufrida en general por los parásitos.

Cabe pues suponer que la aparición de las formas fumagoides de éstos hongos, sea debida a condiciones inherentes al parasitismo intracelular, o intratisular.

SUMMARY

Reviewing the observations of CARINI and the experimental work of ALMEIDA and AREA LEO, MELLO & CURY on the pathogenicity of the etiologic agents of Chromoblastomycosis injected intraperitoneally in Salientia species *Leptodactylus ocellatus* and *L. pentadactylus*, we decided to determine the pathogenicity of *Fonsecaea pedrosoi* on *Bufo marinus*. Six specimens were innoculated with suspensions of cultures of this fungus obtained from six human cases, using one strain per animal.

At autopsy, one observed, besides the subcutaneous nodules described in *Leptodactylus* by the above mentioned authors, cutaneous nodules of typical granulomatous formation. The latter contained the fungus only in the rounded form, similar in all aspects to the fumagoid cells (sclerotic cells of Medlar) found in human lesions and not in the filamentous form found in subcutaneous nodules.

As toads are poikilothermic one can reason and establish that temperature has no influence on the rounding of the thalus of the etiologic agents of Chromoblastomycosis during its parasitic phase, this transformation being a phase of the morphological change which parasites in general undergo.

One can suppose that the appearance of fumagoid forms of these fungi is due to conditions inherent to intratisular or intracelular parasitism.

RIASSUNTO

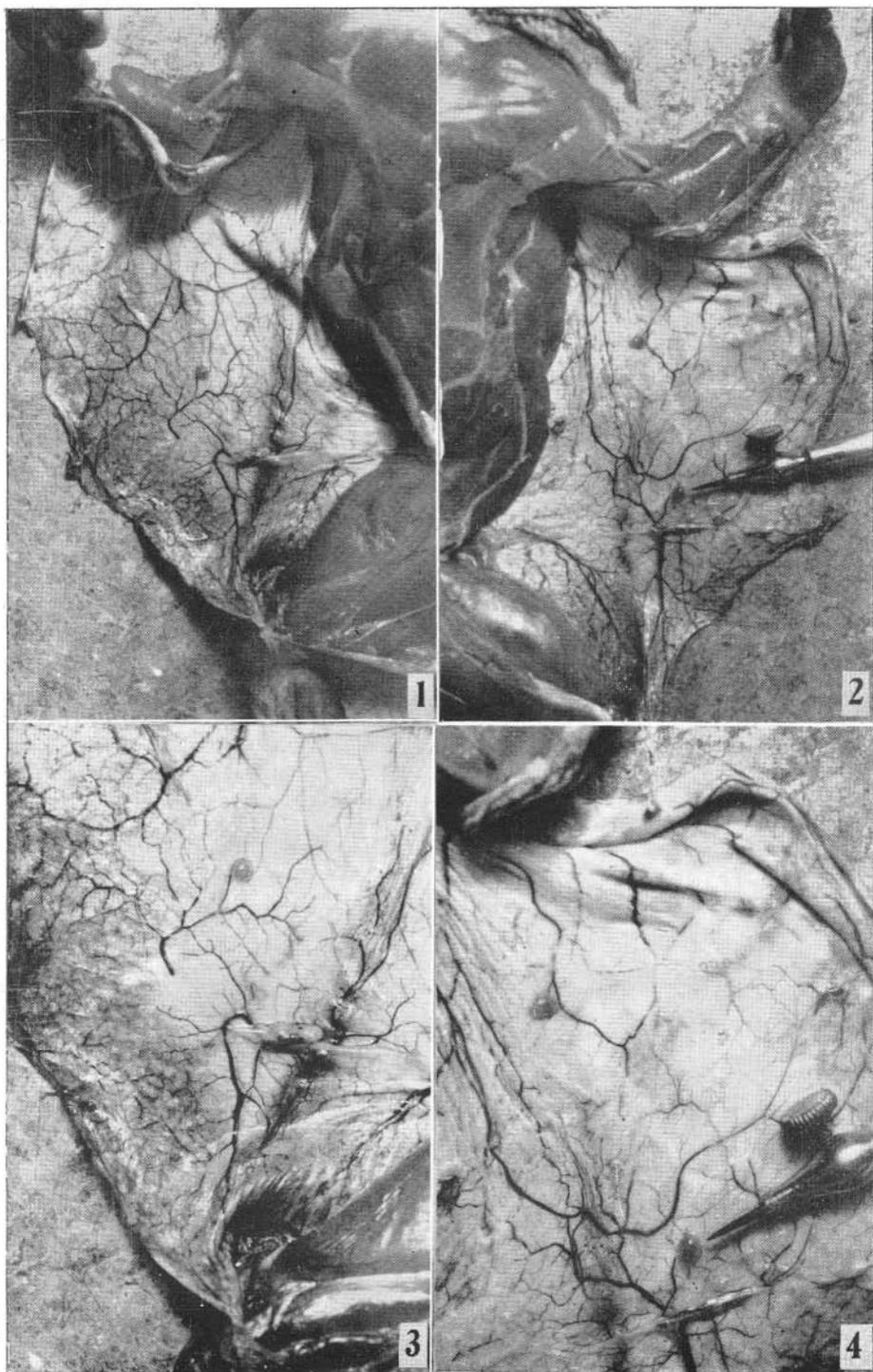
L'Autore considerando le osservazioni fatte da CARINI e le esperienze di ALMEIDA e AREA LEO, MELLO & CURY, sulla patogenicità degli agenti eziologici della cromoblastomicosi, iniettati per via peritoneale agli Anuri della specie *Leptodactylus ocellatus* y *L. pentadactylus*, volle determinare il potere patogeno della *Fonsecaea pedrosoi* sul *Bufo marinus*. Si inocularono sei esemplari con sospensioni di culture di questo fungo prelevate da sei casi umani, usando un ceppo per ciascun animale. Lo studio autoptico presentò, oltre a noduli sottocutanei simili a quelli descritti nel *Leptodactylus* dagli A. A. antecitati, noduli cutanei con tipica costituzione granulomatosa. Questi ultimi presentavano il fungo non in forma filamentosa, abbondante nei noduli sottocutanei, ma solamente in forma arrotondata simile in tutti i suoi aspetti alle cellule fumagoidi che si trovano nei tessuti umani lesionati.

Siccome i rospi sono poichilotermi non si deve pensare che la temperatura abbia influenza sull'arrotondamento del tallo degli agenti della cromoblastomicosi durante la loro fase parassitaria, trasformazione questa che è una modalità della riduzione morfologica sofferta in generale dai parassiti.

Si deve quindi supporre che la apparizione delle forme fumagoidi di questi sia dovuta a condizioni inerenti al parassitismo intracellulare o intratissulare.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ALMEIDA, F. P.
1934. Consideracoes em torno de un cogumelo encontrado por Carini no pumao de sapo (*Leptodactylus pentadactylus*). Nota previa. *Rev. Biol. Hyg.* 5: 51. *Cit. in* AREA LEO y Col. (4).
2. ALMEIDA, F. P.
1934. Chromoblastomycose experimental em sapos. (Nota previa). *Rev. Biol. Hyg.* 5(2): 95 *Cit. in* ALMEIDA (3).
3. ALMEIDA, F. P.
1939. *Mycologia Médica*, XII + 710 pp., 285 figs. Companhia Melhoramentos de Sao Paulo.
4. AREA LEO, A. E., M. T. MELLO & A. CURY.
1947. Cromoblastomicose experimental. *Rev. Brasil. Biol.* 7(1): 5-24.
5. CARINI, A.
1910. Sur une moisissure qui cause une maladie spontanée du "*Leptodactylus, pentadactylus*". *Ann. Inst. Pasteur* 24: 157-160.

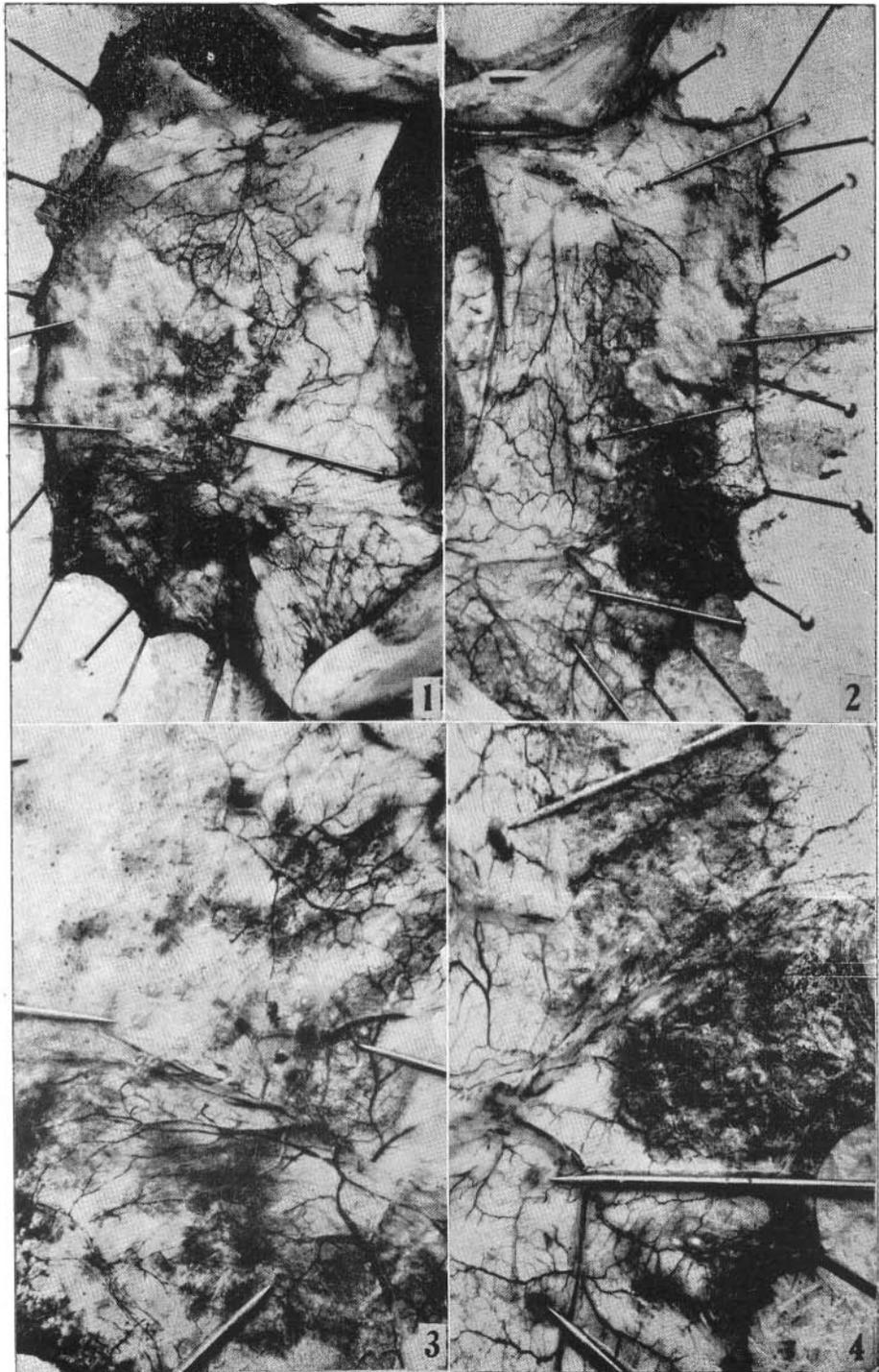


Plancha I

PLANCHA II

- Fig. 1: Sapo N° 4 inoculado con *Fonsecaea pedrosoi*. Lado derecho. Se ven nódulos subcutáneos perláceos pequeños y un nódulo cutáneo negro señalado por el alfiler inferior. (Ligeramente disminuída).
- Fig. 2: El mismo sapo de la figura anterior. Lado izquierdo. Tres nódulos cutáneos señalados por los alfileres y nódulos subcutáneos pequeños. (Ligeramente disminuída).
- Figs. 3 y 4: Detalles de las fotos anteriores aumentadas aproximadamente al doble.

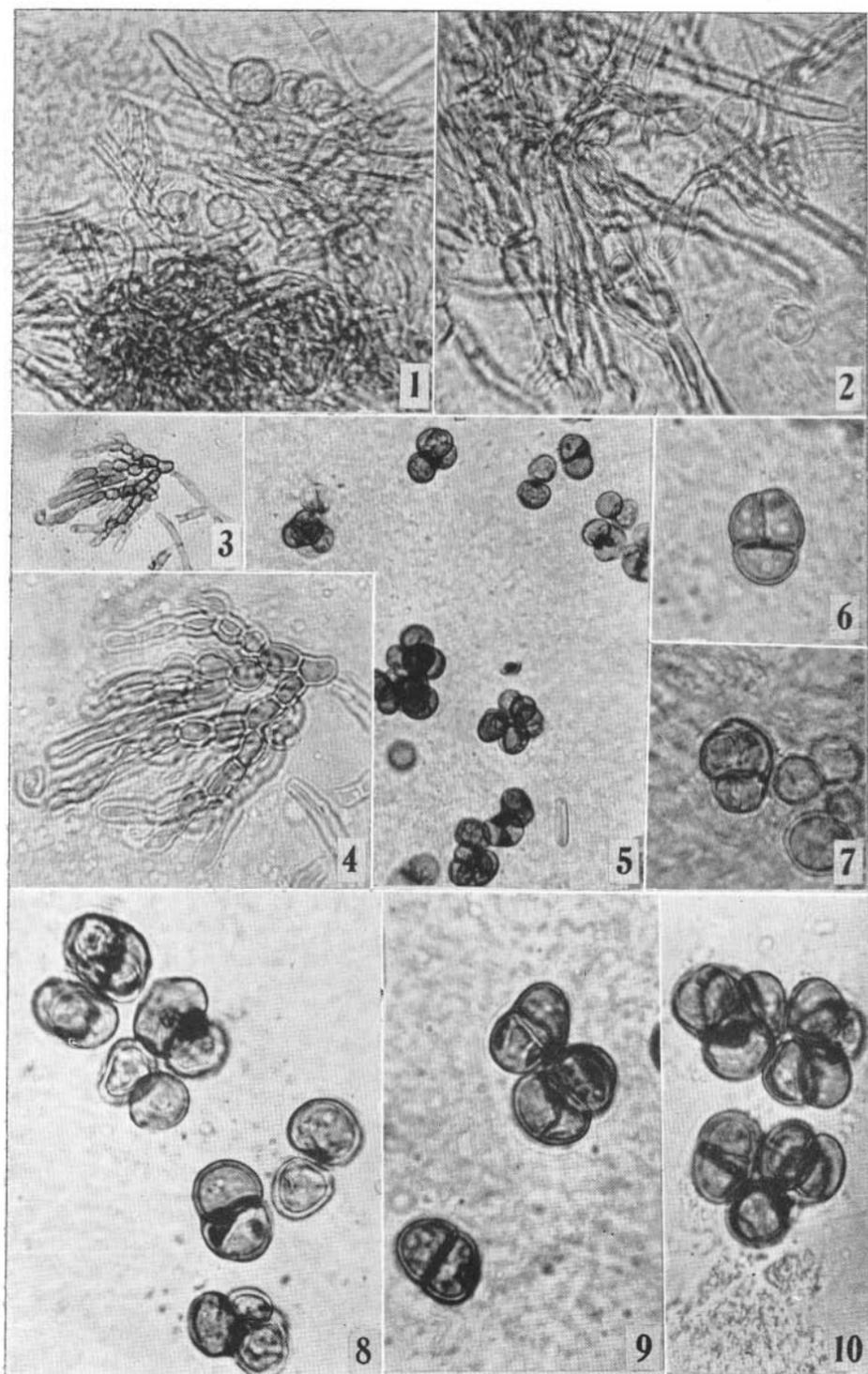
Fotos. A. Esquivel.



Plancha II

PLANCHA III

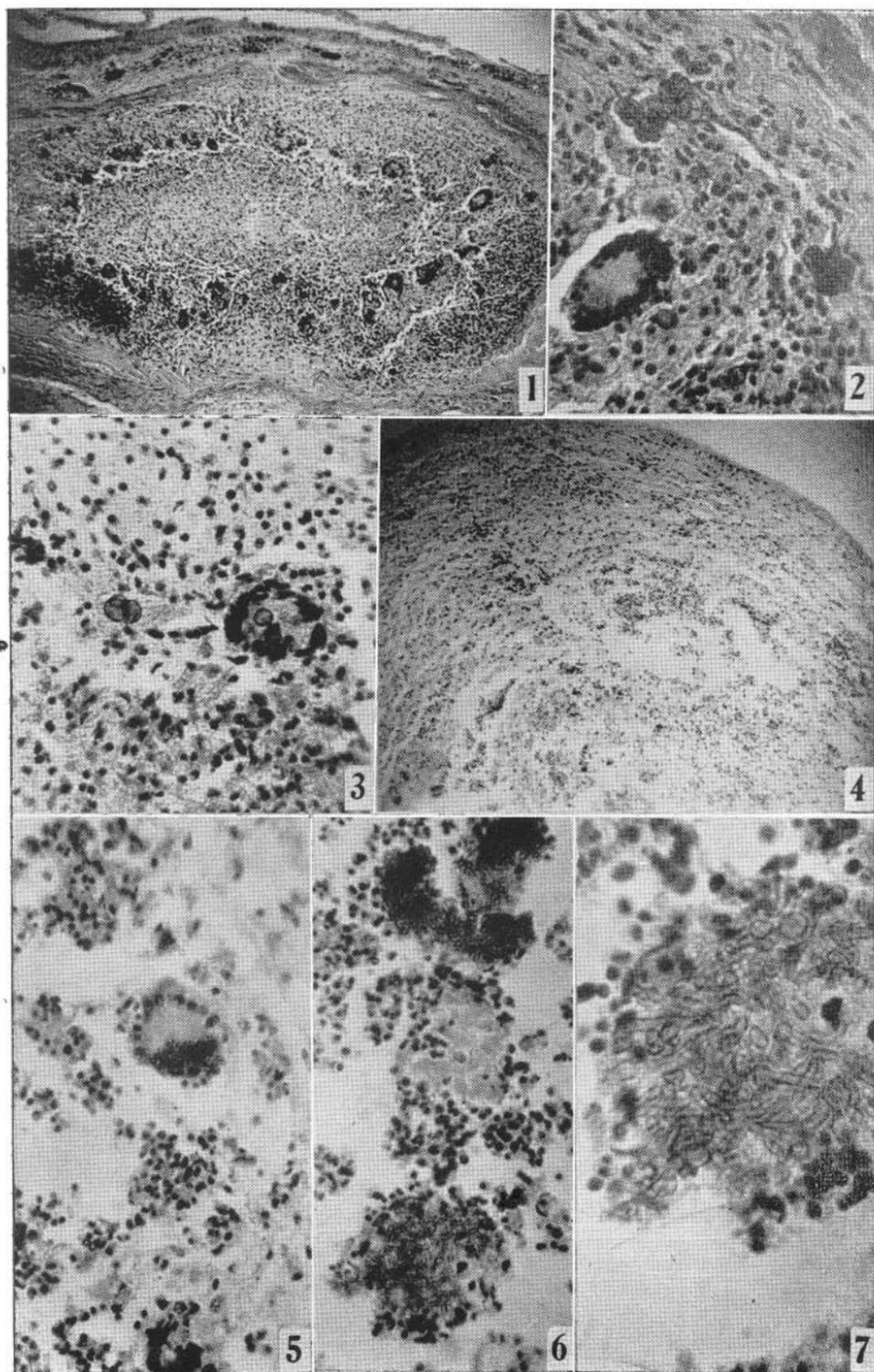
- Figs. 1 y 2: Pus de la fístula del sapo N° 3 mostrando filamentos micelianos y células arredondadas con aspecto de clamidosporas. A fresco, 980 X.
- Fig. 3: Nódulo subcutáneo del sapo N° 3 en que se ven filamentos ramificados con sus células cortas y de paredes más espesas. NaOH al 20 %, 450 X.
- Fig. 4: El mismo campo de la fig. 3, con 980 X.
- Fig. 5: Nódulo cutáneo sapo N° 3. Se observa que el parásito se encuentra únicamente bajo la forma de células fumagoides, arredondadas, dividiéndose por septos, semejantes a las que aparecen en el hombre. NaOH al 20 %, 450 X.
- Fig. 6: Nódulo cutáneo del sapo N° 3. Célula fumagoide con dos septos perpendiculares. NaOH al 20 %, 980 X.
- Fig. 7: Raspado lesión humana de Cromoblastomicosis. Células fumagoides, una de las cuales presenta el mismo aspecto de la célula de la fig. 6. A fresco, 980 X.
- Figs 8, 9 y 10: Nódulo cutáneo del sapo N° 3. Diversos grupos de células fumagoides. NaOH al 20 %, 980 X.



Plancha III

PLANCHA IV

- Fig. 1: Nódulo cutáneo del sapo N° 3. Vista general del granuloma con su centro necrótico, células de aspecto linfocítico, gigantocitos y parásitos. Col. Hematoxilina-eosina, 70 X.
- Fig. 2: Célula gigante del mismo corte anterior, en el interior de la cual se observan parásitos aparentemente en degeneración. Se aprecian también grupos de parásitos y células de aspecto linfocítico. Col. Hematoxilina-eosina, 315 X.
- Fig. 3: Otra célula gigante del nódulo de la figura 1 con parásitos fagocitados. Col. Hematoxilina-eosina, 315 X.
- Fig. 4: Aspecto de un nódulo subcutáneo del sapo N° 3 en que se ve parte de la envoltura fibrosa, células inflamatorias mononucleadas y detritos celulares. El parásito no se aprecia bien. Col. Hematoxilina-eosina, 70 X.
- Fig. 5.—Célula gigante del nódulo subcutáneo de la figura 4 en cuyo interior se encuentra el parásito bajo la forma de hifas cortas. Col. Hematoxilina-eosina, 315 X.
- Fig. 6: Otro detalle del nódulo subcutáneo de la figura 4 que muestra dos grupos de filamentos micelianos cortos y células arredondadas semejantes a clamidosporas. Col. Hematoxilina-eosina, 315 X.
- Fig. 7: Detalle de la figura anterior. Col. Hematoxilina-eosina, 686 X.



Plancha IV