



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

139

FACULTAD DE QUIMICA

MODELO *in vivo* (MURINO) PARA ESTUDIAR A  
*Cladophialophora carrionii*  
COMO AGENTE ETIOLÓGICO DE EUMICETOMA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

OCTAVIO RODRÍGUEZ CORTES



MÉXICO, D. F.



2002

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Prof. ABEL GUTIÉRREZ RAMOS.

**VOCAL:** Prof. JOSÉ ALEXANDRO BONIFAZ TRUJILLO.

**SECRETARIO:** Profa. MA. ANTONIETA SILVA CHÁVEZ

**1er SUPLENTE:** Prof. MISAEL GONZÁLEZ IBARRA.

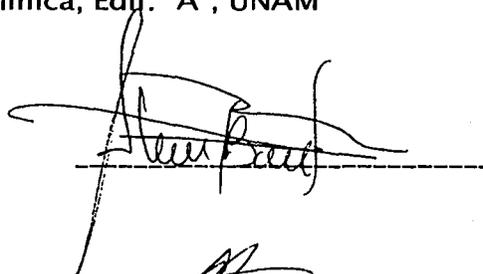
**2º SUPLENTE:** Prof. LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

**Laboratorio de Micología, Hospital General de México, O.D.  
Bioterio de la Facultad de Química, Edif. "A", UNAM**

**Asesor del tema:**

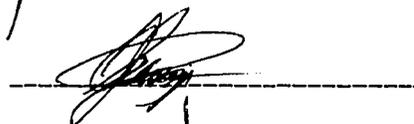
**JOSÉ ALEXANDRO BONIFAZ TRUJILLO**



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José Bonifaz', written over a horizontal dashed line.

**Supervisor Técnico:**

**JAVIER ARAIZA SANTIBÁÑEZ**



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Javier Araiza', written over a horizontal dashed line.

**Sustentante:**

**OCTAVIO RODRÍGUEZ CORTÉS**



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Octavio Rodríguez', written over a horizontal dashed line.

Más que por tradición, por verdadera convicción le dedico el esfuerzo que este trabajo me representó a las siguientes personas e instituciones:

A mi familia, Rosa y Domingo, mis padres, por la educación, el apoyo de siempre y el amor que me brindan. Los quiero. Mis hermanas, Rosi y Aida, mis amigas, cómplices a veces.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a su Facultad de Química, porque no hay mayor orgullo que formar parte de esta comunidad.

Al Hospital General de México, a sus pacientes que son el mejor motivo para superarnos.

A ambas instituciones, reflejo de la realidad mexicana.

A Alexandro Bonifaz, mi maestro. Muchas gracias por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su agradable amistad y simpatía.

A "*Las hadas ignorantes*", por esa magia que son luces en mi vida.

Quiero realizar un reconocimiento a todas las personas que en forma desinteresada y tan amablemente, me ayudaron a realizar este trabajo:

Dr. M. McGinnis y Dr. GS De Hoog, por sus comentarios en la tipificación de la cepa.

Dr. Marco A. Durán Padilla, por su colaboración en la interpretación histopatológica de las biopsias.

M. V. Z. Atonatiu Gómez, y todo el personal del bioterio del edificio "A", de la Facultad de Química. Su ayuda fue clave para la realización de este protocolo. Mil gracias por el apoyo, las facilidades para trabajar y los consejos.

Tec. Histopat. Esperanza Martínez Trejo "*Espi*" por su ayuda en el procesamiento de tantas y tantas laminillas, por su atención y paciencia.

Dra. Gloria González, Dra. Elena Zambrano, Prof. Abel Gutiérrez, Profa. Pilar, por las facilidades prestadas para la realización del proyecto.

A todos ustedes mis más sinceros agradecimientos.

**MODELO *in vivo* (MURINO) PARA ESTUDIAR A**  
***Cladophialophora carrionii* COMO AGENTE**  
**ETIOLÓGICO DE EUMICETOMA.**

# ÍNDICE.

pag

Introducción.

**9**

---

Capítulo 1.

Antecedentes.

1.1 Micetoma.

**16**

Definición.

Epidemiología.

Etiopatogenia.

Aspectos clínicos.

Diagnóstico de laboratorio.

Tratamiento.

Microbiología de los agentes etiológicos.

1.2 Producción experimental de micetoma actino  
y eumicético.

**30**

1.3 Enfermedades por hongos negros.

**32**

1.4 *Cladophialophora carrionii*, aspectos micológicos.

**37**

1.5 Cromoblastomycosis.

**41**

Definición.

Epidemiología.

Etiopatogenia.

Aspectos clínicos.

Diagnóstico de laboratorio.

Tratamiento.

Micología de los agentes etiológicos.

1.6 Feohifomicosis. **48**

Definición.  
Epidemiología.  
Etiopatogenia.  
Aspectos clínicos.  
Diagnóstico de laboratorio.  
Tratamiento.  
Micología de los agentes etiológicos.

1.7 Producción experimental de cromoblastomicosis y feohifomicosis. **53**

1.8 Justificación del tratamiento inmunosupresor. **55**

---

Capítulo 2. **O**bjetivos. **57**

---

Capítulo 3. **H**ipótesis. **58**

---

Capítulo 4. **M**etodología. **59**

Cepa.  
Condiciones de cultivo.  
Preparación de inóculos.  
Esquemas de inoculación y monitoreo del proceso.

---

---

Capítulo 5.	Resultados.	<b>67</b>
Inmunosupresión con hidrocortisona. Inoculación con adyuvante completo de Freund. Inmunosupresión con ciclosporina A.		
<hr/>		
Capítulo 6.	Discusión de resultados.	<b>74</b>
<hr/>		
Capítulo 7.	Conclusiones.	<b>77</b>
<hr/>		
Capítulo 8.	Referencias bibliográficas.	<b>79</b>
<hr/>		
Apéndice.		<b>83</b>
<hr/>		

## INTRODUCCIÓN.

El micetoma es un síndrome anatómico-clínico, que afecta tejido subcutáneo, se localiza principalmente en extremidades. Se caracteriza por presentar una tríada clínica compuesta por aumento de volumen con deformación de la zona afectada, presencia de trayectos fistulosos, a través de los cuales se drena un exudado seropurulento en el cual se encuentran unas estructuras llamadas "granos" que son la forma parasitaria del agente etiológico. Sí bien es un padecimiento que en muy pocos casos tiene un curso letal o afecta al estado general, si llega a producir invalidez del miembro afectado. Los agentes etiológicos de esta enfermedad varían en diferentes zonas geográficas<sup>(1-9)</sup> En nuestro país un 95% de los casos son causados por bacterias filamentosas aerobias, actinomicetos, en sólo el 5% de los casos el agente etiológico son hongos verdaderos<sup>(1,3)</sup> En la actualidad existe una lista de 31 especies de hongos causantes de eumicetoma<sup>(9)</sup> En esta lista, no se incluye a *Cladophialophora carrionii*, el cual es reconocido como agente causal de cromoblastomycosis, otra micosis subcutánea de curso crónico, que se caracteriza por lesiones nodulares, verrugosas localizadas principalmente en miembros inferiores y excepcionalmente se comporta como oportunista dando otra micosis denominada feohifomicosis<sup>(1-4,14)</sup> Una cepa de dicha especie, fue aislada de un paciente que por clínica, estudios micológicos e histopatológicamente manifestaba un micetoma en una de las extremidades inferiores. Sin duda, éste es el primer caso reportado de micetoma por *C. carrionii*.

Para que un microorganismo sea considerado como agente etiológico de micetoma, el reporte del caso clínico debe ser presentado con una historia clínica adecuada en donde se describa que el paciente presentó la tríada clínica ya mencionada, en donde los granos sean claramente caracterizados y descritos ya sea en exudado y/o tejido, pero sobre todo que se observen granos, además de que el microorganismo recobrado del cultivo sea identificado<sup>(9)</sup> El caso presentado cumple con estos criterios.

Por otra parte, la reproducción experimental de una enfermedad, es muy útil para estudiar aspectos relacionados a la patogenia y factores predisponentes para el desarrollo de una enfermedad. La producción experimental de una enfermedad tiene que cumplir con los postulados de Koch: (1) primeramente el patógeno tiene que presentar una asociación con la enfermedad, éste debe ser aislado de individuos enfermos y no de personas sanas, (2) obtener un cultivo puro, (3) la enfermedad debe ser reproducible en un hospedero susceptible cuando sea inoculado con un cultivo puro, (4) por último el patógeno tiene que ser recobrado de este hospedador.

Hipotéticamente, cuando *C. carrionii*, sea inoculado en ratones, pueden ocurrir tres posibilidades, que se produzca un micetoma, una cromoblastomycosis o una feohifomicosis.

Por lo tanto el objetivo de este trabajo es establecer cuales son las condiciones bajo las cuales se establecen estas enfermedades.

---

# Capítulo 1:

## Antecedentes.

---

### 1.1 Micetoma.

#### Definición.

El micetoma es un síndrome de tipo infamatorio crónico caracterizado por una tríada clínica constituida por aumento de volumen, con deformación de la región que afecta, lesiones de aspecto nodular, fistulizadas y de donde drena un exudado filante, que contiene las formas parasitarias denominadas "granos" o "gránulos"; su etiología se debe a diversas bacterias filamentosas, actinomicetos aerobios, y a hongos que producen actino y eumicetoma, respectivamente. Los cuales penetran por inoculación traumática exógena. Los tejidos afectados son la piel, tejido celular subcutáneo, aponeurosis, óseo y rara vez vísceras<sup>(1-5,8-10)</sup>

Los microorganismos que participan también pueden causar otras enfermedades clínicas, como nocardiosis, feohifomicosis, granuloma micótico, y cromoblastomicosis<sup>(1-7. 10)</sup>

Esta enfermedad también es conocida a menudo como Pie de Madura o Maduromicosis.

## **Epidemiología.**

El micetoma se presenta en zonas geográficas muy específicas y definidas, éstas por lo regular están comprendidas entre el Trópico de Cáncer y el Trópico de Capricornio, región en donde se encuentran las condiciones climatológicas necesarias para el desarrollo de los agente etiológicos. En dicha región quedan comprendidos dos tipos de climas: subtropical y tropical senegalés con un rango de temperatura entre 10-20°C a 20-40°C y una precipitación pluvial anual entre 500 y 1,000mm. Ambos grupos de agentes etiológicos han sido aislados de la naturaleza, suelo, madera, plantas (principalmente cactáceas)<sup>(1-3)</sup>

Las principales zonas endémicas se localizan en tres continentes: África (Sudán, Somalia, Senegal, Nigeria, Chad y Níger), Asia ( La India) y América ( México, Venezuela, Brasil, Argentina y El Salvador)<sup>(1-3)</sup>

En África y Asia los agentes etiológicos principalmente son hongos, mientras en México y Venezuela son actinomicetos<sup>(1-9)</sup>

Las zonas endémicas de nuestro país son 4: (1) estados de Guerrero y Morelos, (2) zona norte del estado de Veracruz (3) frontera entre norte de San Luis Potosí y sur de Nuevo León, (4) sur de Sinaloa<sup>(1,4)</sup>

La enfermedad se presenta con mayor frecuencia en adultos entre la 3ª y 5ª década de la vida, es un padecimiento raro en niños<sup>(1,4)</sup> Predomina en el sexo masculino en una proporción 5:1; muchos autores explican esta relación debido a que la principal ocupación es aquella relacionada con las labores propias del campo<sup>(1-9)</sup> Sin embargo, esto no es del todo cierto, ya que en muchos de estos países las labores del campo las realizan hombre y mujer por igual. Por otra parte existen varios estudios que demuestran la influencia hormonal en el desarrollo *in vitro* de algunos agentes etiológicos del micetoma<sup>(1,7)</sup>

## **Etiopatogenia.**

El micetoma es un síndrome con pluralidad etiológica. Varios autores coinciden al presentar una lista de los agentes etiológicos del micetoma,<sup>(1,2,4,9)</sup> la cual se presenta en la tabla 1

En México del 95 a 97 % son actinomictomas, de los cuales el género *Nocardia* representa el 85% de los agentes causales y 10% corresponde al género *Actinomadura* (*N. brasiliensis* y *A. madurae* en más del 90%, respectivamente) El 5% restante es para los eumictomas, los de grano negro ocupan el 4% y de grano blanco sólo el 1%.<sup>(1,2,6)</sup>

Los microorganismos causales viven como sapróbios en la naturaleza, en el suelo o los vegetales. Se introducen a la piel del hospedero por medio de algún traumatismo ( astillas de madera, espinas, instrumentos de labranza, etc) Después de la penetración, se observa crecimiento lento del microorganismo. En general hay una alta resistencia a la infección. Después de semanas o meses, tiempo en el cual pueden ocurrir inoculaciones subsecuentes, los microorganismos emiten filamentos en los tejidos y se agregan en una masa de hifas compactas llamadas "granos", de esta manera resisten más y ocupan el menor espacio.<sup>(1,2,3,9)</sup> Los granos logran su agregación por un "cemento" compuesto por sustancias producidas tanto por el hospedero como el microorganismo<sup>(1,9)</sup>

En particular McGiniis<sup>(9)</sup> llama a la forma parasitaria del micetoma *esclerocio* y lo define como un agregado de hifas vegetativas, sólido, con o sin la agregación de sustancias del tejido del hospedero y generalmente sin esporas dentro de la estructura.

Existen dos aspectos muy importantes que están implicados en el desarrollo del micetoma. La primera es el efecto de alteraciones en las defensas del hospedero y el segundo es la habilidad del microorganismo para resistir o evadir las defensas del hospedero<sup>(1-9)</sup>

Existe muy poca evidencia de anormalidades clínicas en un paciente que desarrolla micetoma. En un estudio<sup>(7,9)</sup> se demostró que en los pacientes con defectos en la respuesta inmune celular de sus linfocitos T a fitohemaglutinina, eran más severamente afectados por el micetoma o fallaban en su respuesta al tratamiento. Este estudio es reforzado por el hecho de que el micetoma experimental por *Madurella mycetomatis* en ratones es virtualmente imposible producirlo, excepto en ratones atímicos *nu/nu*.<sup>(7)</sup>

Por otra parte existen estudios que demuestran que los pacientes con micetoma no presentan ninguna diferencia significativa en su respuesta de linfocitos T comparados con pacientes sanos<sup>(7,9)</sup>

Respecto a los microorganismos estos también tienen que ser capaces de presentar cambios para poder desarrollar en el tejido (potencial más reducido, nutrimentos, temperatura) Conforme se va formando el grano en el tejido las paredes celulares del hongo se vuelven engrosadas, especialmente las células de la periferia y se fusionan una con otra. Hay también un aparente exceso en la producción de polisacáridos componentes del citoesqueleto de las paredes fúngicas. Tales alteraciones en la pared celular hacen al hongo menos penetrable a fármacos antifúngicos y a las moléculas de adhesión que interfieren con la interacción leucocito-pared celular<sup>(7,9)</sup>

Algunos hongos tales como *Madurella mycetomatis* y *M. grisea* elaboran un cemento extracelular que parece ser 1,8-dihidroxi-naftaleno-melanina que se combina con restos celulares y proteínas del hospedero. El cemento parece agregar fuerza al grano y protegerlo contra fármacos antifúngicos, anticuerpos y enzimas hidrolíticas que pudieran dañar la pared celular. Las microfibrillas asociadas con la pared celular de las hifas del grano de *M. mycetomatis* se cree que son polisacáridos. Las microfibrillas también pueden contener 1,8-dihidroxi-naftaleno-melanina. Estos componentes del grano, con los polimorfonucleares y los restos celulares alrededor del grano, pueden proveer un medio de protección para el hongo<sup>(7,9)</sup>

	Agente etiológico	Color del grano
ACTINOMICETOS	<i>Nocardia brasiliensis</i> <i>N. asteroides</i> <i>N. caviae</i> <i>Nocardiosis dassonvillei</i> <i>Actinomadura madurae</i> <i>A. pelletieri</i> <i>Streptomyces somaliensis</i> <i>S. paraguayensis</i>	Blanco Blanco Blanco/amarillo Crema Blanco/amarillo Rojo Amarillo pardo. Amarillo pardo.
HONGOS NEGROS	<i>Corynespora cassicola.</i> <i>Curvularia lunata.</i> <i>C. geniculata.</i> <i>Exophiala jeanselmei</i> <i>Leptosphaeria senegaliensis</i> <i>L. tompkinsii</i> <i>Madurella mycetomatis</i> <i>M. grisea</i> <i>Phialophora verrucosa</i> <i>Plenodomus avramii</i> <i>Pseudochaetophaeronema larense</i> <i>Pyrenochaeta mackinnonii</i> <i>P. romeroi</i>	Grano  Negro
HONGOS HIALINOS	<i>Acremonium falciforme</i> <i>A. kiliensi</i> <i>A. racifei</i> <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Cylindrocarpon destructans</i> <i>Fusarium spp.</i> <i>F. moniliforme</i> <i>F. oxysporum</i> <i>F. solani</i> <i>F. solani var coeruleum</i> <i>F. solani var. minus</i> <i>Neotestudina rosatii</i> <i>Polytella hominis</i> <i>Pseudoallescheria boydii</i> Dermatofitos ( <i>T. rubrum</i> , <i>M. canis</i> , <i>M. audouinii</i> )	Grano Blanco

TABLA 1 Agentes etiológicos de actino y eumicetoma<sup>(1-4,9)</sup>

La lesión primaria es un proceso tumoral que invade en forma local, no es doloroso, o bien es una inflamación pequeña, poco dolorosa y subcutánea, que aumenta en forma lenta y se reblandece. Se desarrolla un absceso purulento agudo, resolución y nuevo desarrollo, excavación en muchas direcciones por debajo de la dermis e invasión de tejido blando y hueso que hace erupción en la superficie mediante trayectos fistulosos que se abren paso, en general son respetados los tendones, nervios y músculo. A medida que las áreas nuevas se convierten en activas, en las áreas viejas hay cicatrización con fibrosis extensa. <sup>(1,2)</sup>

En general la respuesta histológica en el micetoma es esencialmente la misma independientemente del agente etiológico. Histopatológicamente se forma una reacción inflamatoria compuesta principalmente por células polimorfonucleares (PMN) y tejido de fibrosis<sup>(1)</sup> También pueden encontrarse células epitelioides, macrófagos y células gigantes multinucleadas. Lesiones con mucho tiempo, particularmente óseas con degeneración del grano o piezas del cemento, frecuentemente contienen células gigantes multinucleadas y células epitelioides. Células como linfocitos, plasmocitos e histiocitos separan el absceso de la envoltura del tejido fibroso<sup>(1,2,4,9)</sup>

En una investigación EL Hassan<sup>(10)</sup>, describió histopatológicamente la producción de los granos de *M. mycetomatis*, estableciendo que existen 3 tipos de reacciones que pueden coexistir en la misma lesión.

Tipo I: Existe una zona de neutrófilos en la vecindad del grano. Estos son algunas veces encontrados adentro de la sustancia que forma el grano, causando su desintegración. Algunos histiocitos pueden ser vistos entre los neutrófilos, pero son más numerosos fuera de la zona de neutrófilos.

Tipo II: Los neutrófilos desaparecen en gran medida y son remplazados por histiocitos y células gigantes multinucleadas. Algunas de estas células contienen fragmentos de granos o cemento pigmentado sin hifas. Los macrófagos pueden contener un pigmento

negro derivado del grano. En esta etapa el grano ya es pequeño y fragmentado.

Tipo III: El material del grano ha desaparecido en gran medida o completamente dejando un granuloma epitelioides con o sin células gigantes de Langerhans. Esta es una reacción poco común ya que representa una regresión espontánea en algunos granos<sup>(9,7)</sup>

Esta descripción aunque es particular para *M. mycetomatis*, puede servir como una guía para estudiar la histología de otros hongos dematiáceos, como es el caso de estudio y probablemente de los hialohifomicetos.

### **Aspectos clínicos.**

La localización más frecuente del micetoma es en las extremidades. En el ámbito mundial la región más afectada son las extremidades inferiores, seguidas por las superiores. En nuestro País es muy frecuente también la localización en tronco. Aunque cabe aclarar que han sido reportadas muchas otras localizaciones en forma menos frecuente (cráneo, tórax, periné, entre otras)

Las localizaciones en extremidades al hacerse crónicas pueden causar invalidez del miembro, pero no son peligrosas, mientras que las localizaciones craneales, abdominales y en tronco son consideradas de alto riesgo<sup>(1,4)</sup>

Como ya se mencionó el micetoma presenta lesiones que cumplen con la tríada clínica: aumento de volumen con deformación de la región, presencia de lesiones nodulares con fístulas (que en ocasiones tienen anillos carnosos o puede estar deprimidos) y presencia de un exudado seropurulento por donde drenan los "granos" los cuales pueden ser micro o macroscópicos.<sup>(1-4,9)</sup>(Fig. 1)

Puede considerarse, que clínicamente los micetomas se observan igual, independientemente de su agente etiológico, aunque se ha insistido en ciertas diferencias, ya que los micetomas por *N. brasiliensis* y *A. pelletieri* tienen a ser más inflamatorios y fistulizados, mientras que los causados por *A. madurae*, *S. somaliensis* y los eumicetomas tienen a ser más leñosos, fibrosos y menos fistulizados<sup>(1)</sup> Características observadas en los eumicetomas vistos en el servicio.

El padecimiento es crónico y avanza hacia el tejido celular subcutáneo, aponeurosis y llegar hasta hueso. Es importante decir que hay algunos agentes más osteofílicos que otros, *N. brasiliensis*, *A. madurae* y *M. mycetomatis*, son los más osteofílicos. En el caso de las lesiones óseas, en la fase avanzada de la enfermedad, puede haber múltiples cavidades a través de la densidad del hueso. Estas cavidades son grandes en tamaño, pocas en número y con márgenes bien definidos en los eumicetomas. Mientras, las cavidades en el actinomicetoma son usualmente pequeñas en medida, numerosas y sin márgenes bien definidos. Las cavidades son producidas por el reemplazo del tejido óseo por los granos y tejido fibroso, su tamaño es debido al tamaño de los granos, los cuales proveen el soporte del hueso. Esto puede explicar que en el micetoma es rara la fractura. Dependiendo de la localización puede llegar hasta vísceras, pulmones, etc<sup>(8, 1,3)</sup>

El micetoma es una enfermedad en general asintomática, no dolorosa y los pacientes tan solo refieren un ligero prurito. Cuando el padecimiento se vuelve crónico, puede tornarse doloroso. Es muy frecuente que exista una infección bacteriana secundaria<sup>(1,4)</sup>

Los principales diagnósticos diferenciales del micetoma son: osteomielitis, tuberculosis colicuativa, hidrosadenitis<sup>(1-3)</sup> Existen pseudomicosis en las que los agentes etiológicos también forman "granos". Éstas son la actinomicosis, cuyo agente etiológico es un actinomiceto microaereofílico endógeno llamado *Actinomyces israelii* y la botriomicosis originada por un grupo de bacterias no filamentosas, principalmente *S. aureus*, *Ps. aeuroginosa* y *E. coli*<sup>(1)</sup>

## **Diagnóstico de laboratorio.**

Aparte de las características clínicas que presenta el micetoma, son indispensables estudios micológicos, de laboratorio y gabinete para llegar al diagnóstico, establecer un tratamiento y pronóstico<sup>(1-9)</sup>

Para los estudios de laboratorio, la muestra requerida es precisamente el exudado sero-sanguinolento que drena de las fístulas activas. Cuando no existen fístulas o éstas no se encuentran activas la muestra proviene de la biopsia. La muestra se cultiva y se le realizan exámenes directos.

### Examen directo:

El exudado se coloca en una laminilla, se le agrega una gota de lugol como medio de contraste, y se observa al microscopio buscando los granos. Estos pueden ser micro o macroscópicos. El hecho de encontrar los granos confirma el diagnóstico de micetoma, sin embargo, no debe darse tratamiento hasta confirmar género y especie del agente etiológico<sup>(1-9)</sup>(Fig.2)

La morfología del grano en el examen en fresco nos puede orientar para determinar el agente etiológico. En la tabla 2 se presentan las características de los granos más comunes en México. Además del examen en fresco es muy importante observar las características tintoriales del grano en la biopsia, también útiles para identificar el agente etiológico<sup>(9)</sup>

### Cultivos:

Las muestras se siembran regularmente en agar Sabouraud, papa dextrosa. Cuando se sospecha de actinomicetos no sembrar en medios con cloramfenicol y si se sospecha de un hongo, no sembrar en medios con ciclohexamida Para la mayoría de los actinomicetos el tiempo de desarrollo es entre 8 a 15 días a temperatura ambiente. Los hongos tardan en desarrollarse entre 15 a 30 días.

Las características macro y microscópicas de los agentes causales serán revisados más adelante.

Tipo de grano	Tamaño	Color	Forma	Otros
Tipo <i>Nocardia</i>	50-150 $\mu$ m microsifonado	Blanco amarillento	Lobulado "fetoide"	Clavas en Periferia.
<i>A. madurae</i>	1 a 5 mm microsifonado	Blanco Amarillento	Redonda, Irregular, Lobulado.	Blando, Pseudoclavas En periferia.
<i>A. pelletieri</i>	200 a 300 $\mu$ m microsifonado	Rojo	Redondo, Agrupado.	
<i>S. somaliensis</i>	0.5 a 1.0 mm microsifonado	Blanco grisáceo	Redondo	Duro
Eumicético Negro	0.5 a 5.0 mm Macrosifonado	Negro o Café ocre	Irregular	En ocasiones clamidoconidias, vesículas.
Eumicético Blanco	0.5 a 3.0mm Macrosifonado	Blanco Amarillento	Irregulares	

TABLA 2 Morfología de los principales tipos de granos en el examen en fresco<sup>(1,3,4,9)</sup>

### Biopsias:

La respuesta histológica es igual independientemente del agente etiológico y se caracteriza por presentar un cuadro inflamatorio agudo al nivel de la dermis desde superficial hasta profunda, en donde los granos se localizan en el centro de un microabsceso rodeado de polimorfonucleares, en la periferia de este absceso se encuentra una zona de fibrosis y fuera de esta zona hay otras células como plasmocitos, linfocitos, células gigantes y también se observa un aumento en la vascularización. Excepcionalmente se encuentran imágenes de verdaderos granulomas tuberculoides<sup>(1-4)</sup> Para ilustrar la respuesta histológica se presenta la histopatología del micetoma por *Cladophialophora carrionii* (Fig.3)

La biopsia cobra importancia en casos en donde no se logren encontrar los granos en el examen directo, también son muy útiles para estudiar a éstos, ya que de acuerdo a sus afinidades tintoreales pueden orientar hacia la identificación del agente etiológico. En la tabla 3 se resumen éstas características de los granos más comunes en nuestro país. La tinción de rutina Hematoxilina y Eosina (H&E) en la gran mayoría de los casos es suficiente para resaltar las estructuras fúngicas<sup>(9)</sup>(Fig.4)

Tipo de grano	Descripción
Granos tipo <i>Nocardia</i> .	40-50µm; redondos polilobulados, de color azul pálido, en el centro hay escasos microfilamentos, algunas granulaciones. Rodeado por clavas eosinofílicas de 8-18 µm. Reacción inflamatoria intensa.
Grano de <i>A. madurae</i>	1-10mm; filamentos teñidos con hematoxilina, forma cartográfica, borde eosinofílico, pseudoclavas que no lo rodean por completo. Reacción inflamatoria más discreta.
Grano de <i>M. mycetomatis</i>	1 mm; color pardo, no toma los colorantes, filamentos macrosifonados que se observan concéntricos y radiados.
Grano de <i>M. grisea</i>	1-2mm; filamentos macrosifonados que se tiñen con eosina en la periferia, y centro pálido, vesiculado en la periferia.
Grano de <i>P. boydii</i>	3 mm; redondos u ovalados, polilobulados y presentan vesículas.

Tabla 3 Descripción de las afinidades titoreales de los principales agentes etiológicos de micetoma en México. Tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E) Hematoxilina: Lila, Eosina: Rosa(9)



FIG.1 Micetoma en dorso de pie.

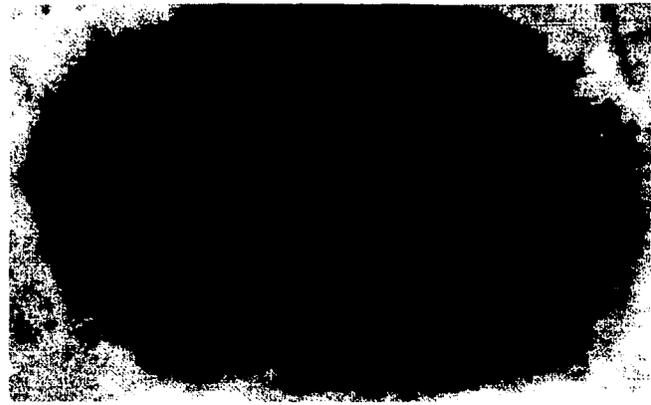


FIG. 2 Examen directo del grano de *C. carrionii* (40x)

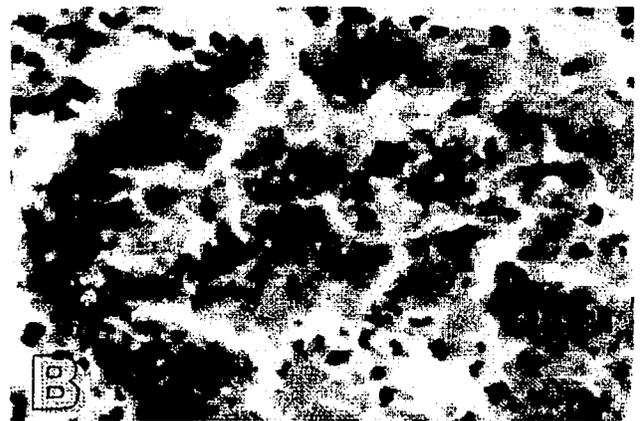
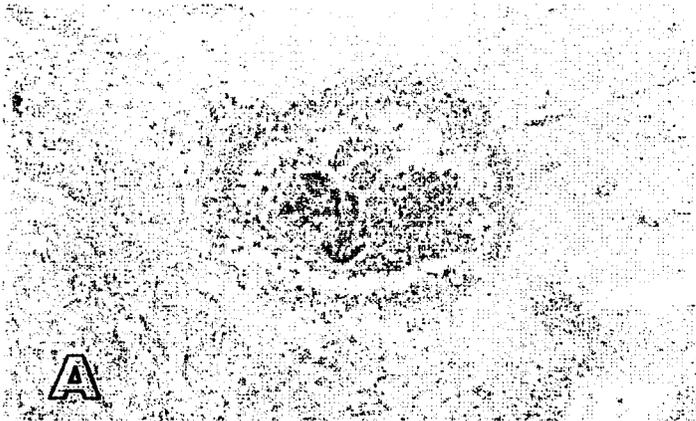


FIG. 3 (A) Grano de *C. carrionii* con el alrededor del granuloma inflamatorio y fibrosis, formado a su alrededor (10x) en (B) se observan los elementos miceliales del grano a 40x. Debido al pigmento propio del hongo no requiere tinciones especiales (H&E)



FIG. 4 Afinidades tintoreales con H&E de un grano tipo *Nocardia*(A), *A. madurae*(B), *M. mycetomatis*(C),

### Pruebas inmunológicas:

En general las pruebas serológicas tienen la desventaja de que la respuesta inmune humoral no está bien estudiada para los micetomas, existe un gran número de agentes causales que presentan cruces antigénicos entre sí, incluso con PPD y antígenos de *M. leprae*, además de que se tendría que realizar una selección de los patógenos que prevalecen en determinada área geográfica. <sup>(1,3,7,8)</sup>

En años recientes se ha desarrollado una prueba serológica por ELISA (basada en dos antígenos inmunodominantes de 24, 26 KDa obtenidos de un extracto celular de *N. brasiliensis*) que sirve de parámetro diagnóstico de los micetomas causados por *N. brasiliensis*. Esta prueba no cruza con pacientes de lepra, ni tuberculosis y es útil para evaluar la respuesta al tratamiento y pronóstico<sup>(7)</sup>

Para eumicetomas existen pruebas de inmunodifusión y contraelectroforésis, pero no son altamente específicas, por lo que no son utilizadas como diagnóstico.

### Rayos X:

Siempre deben tomarse placas de la zona afectada para valorar si existe afección ósea o de alguna víscera según la localización de las lesiones<sup>(1,3,7)</sup>

Actualmente existen otras herramientas de imagenología aplicadas en el diagnóstico del micetoma como la imagen de ultrasonido, la cual es muy precisa y exacta en lesiones sin fístulas. El tamaño y la extensión de las lesiones pueden determinarse con precisión ultrasónicamente y esto ayuda a planear las incisiones y procedimientos quirúrgicos<sup>(7)</sup>

## Tratamiento.

Para el micetoma existen varios planes terapéuticos, los cuales dependen principalmente del agente etiológico y el avance del proceso. En general, los actinomicetomas son más sensibles al tratamiento que los eumicetomas. Debido a que el enfoque de este texto tiene que ver más con los aspectos microbiológicos y patológicos sólo se mencionarán brevemente las alternativas terapéuticas.

### Actinomicetoma:

La terapia de primera elección para estos micetomas por *Nocardia*, sigue siendo la misma que se implementó por Latapi<sup>(1-3)</sup> desde hace 50 años, basado en sulfonamidas.

DiaminoDifenilSulfona (DDS) 100 a 200 mg/día más Trimetropin-Sulfametoxazol (TMS) 400-80 a 800-160mg/día. Este esquema es efectivo en la mayoría de los casos por *Nocardia sp.* es barato, pero tiene el inconveniente de prolongarse por años. Una segunda opción para los microorganismos resistentes o no sensibles puede ser amikacina 15 mg/kg/día por 3 semanas con periodos iguales de descanso. Un tercer esquema para casos resistentes es la combinación de amoxicilina-ácido clavulánico (500-125mg) cada 8-12h por 3-6meses<sup>(1-5,7,9,10)</sup>

Debido a la buena respuesta a los quimiotratamientos, la amputación es un procedimiento totalmente contraindicado en casi la totalidad de los casos.

### Eumicetoma:

En general tienen muy baja respuesta a los antifúngicos. La combinación más utilizada con mejores resultados es la resección quirúrgica con amplio margen en combinación con imidazoles: ketoconzol 200 a 400 mg/día, itraconazol 200-400mg/día o alilaminas como terbinafina 250 a 500 mg/día por meses o años<sup>(1,7)</sup>

## **Microbiología de los agentes etiológicos.**

En este trabajo sólo se enfocará en los microorganismos más frecuentemente aislados de actino y eumicetoma en nuestro país: *Nocardia brasiliensis*, *Actinomadurea madurae*, *Madurella mycetomatis*, *Madurella grisea*, *Pseudoallescheria boydii*.

**ACTINOMICETOS:** La identificación de actinomicetos esta basada en la composición química de su pared celular, morfología colonial y del micelio, y pruebas fisiológicas, térmicas y bioquímicas.

Las pruebas más utilizadas en los laboratorios de Micología son fisiológicas, bioquímicas y térmicas, sin embargo, éstas son las que tienen mayor variabilidad. Por lo que la prueba que tiene mayor confiabilidad es la determinación de la composición química de pared celular<sup>(3)</sup>

En la pared celular de estos actinomicetos se buscan principalmente 3 compuestos: Ácido DiaminoPimélico (DAP), ácidos derivados de carbohidratos, y ácidos micólicos. Estos compuestos se determinan por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y de capa fina (TLC) Estas metodologías tienen el inconveniente de ser caras y de requerir personal calificado<sup>(3)</sup>

*Nocardia brasiliensis* : Produce una colonia de crecimiento lento, acuminada, rugosa de color amarillo a naranja y tiene una consistencia membranosa. Los filamentos son microsifonados de 0.5 a 1.0  $\mu\text{m}$  de diámetro, segmentado, es Gram positivo y parcialmente Alcohol Ácido Resistente.

*Actinomadurea madurae*: El microorganismo desarrolla rápidamente en medio de Lowenstein-Jensen, y más lento en agar Sabouraud, su temperatura óptima de crecimiento es a 37°C. La colonia es cerosa, cerebriforme en el centro y pequeña. Los elementos miceliales son microsifonados de 0.5 a 1.0  $\mu\text{m}$  de diámetro, produce cadenas pequeñas de esporas. Es Gram positivo y no Alcohol ácido resistente.

En la tabla 4, se presentan algunas características morfológicas, químicas y tintoriales para diferenciar entre los géneros *Nocardia* y *Actinomadura*.<sup>(1,3,7)</sup>

Para diferenciar entre las especies, se recurre a pruebas fisiológicas y bioquímicas. Estas se resumen en la tabla 5 para los géneros *Nocardia* y *Actinomadura*.<sup>(1,3,7)</sup>

<b>ELEMENTOS DIFERENCIALES</b>	<b><i>Actinomadura</i></b>	<b><i>Nocardia</i></b>
Morfología del micelio	Abundante ramificado	Filamentos fragmentados en formas cocoides.
Componentes de pared celular	<i>Meso</i> -DAP, madurosa	<i>Meso</i> -DAP, Arabinosa, galactosa
Lípido de pared celular	Ausencia de ácido micólico	Presencia de ácido micólico
Susceptibilidad a lisozima	Susceptible	Resistente
Tinción de Gram	Negativo	Positivo
Tinción de Ziehl-Neelsen	Negativo	Parcialmente positivo

Tabla 4: Criterios bioquímicos y tintoriales para diferenciación entre los géneros *Nocardia* y *Actinomadura*

<b>Organismo</b>	<b>Caseína</b>	<b>Tirosina</b>	<b>Xantina</b>	<b>Producción de celobiosa</b>	<b>Producción de ureasa</b>
<i>N. asteroides</i>	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
<i>N. brasiliensis</i>	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos
<i>N. caviae</i>	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos
<i>A. madurae</i>	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg
<i>A. pelletieri</i>	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg

Tabla 5: Perfil bioquímico para la diferenciación de las especies de *Nocardia* y *Actinomadura*

EUMICETOS: La identificación de estos agentes es basándose principalmente en la morfología macro y microscópica. Sin embargo, la formas de fructificación de estos hongos en algunas especies es escasa o muy variable, depende mucho de las condiciones de cultivo e incluso bajo las mismas condiciones de cultivo puede presentarse mucha variabilidad<sup>(3)</sup>

***Madurella mycetomatis.*** La descripción de este hongo es muy variable debido a que esta especie presenta mutaciones. La temperatura óptima de desarrollo es 37°C. En un principio a colonia es plegada y apilada color blanco amarillento cubierta con vello gris, posteriormente se torna de color pardo ocre con pigmento del mismo color difusible. Produce hifas macrosifonadas de 1 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, también puede presentar células vesículas alargadas de hasta 25  $\mu\text{m}$ . En colonias de más de dos meses, en medio de papa-zanahoria se pueden formar esclerotes (estructuras de resistencias estériles formados por micelio) de color negro de 1mm de tamaño. Las colonias viejas toman un color pardo-rojizo. Se han descrito dos tipos de conidiación en agar harina de maíz: conidias piriformes (3-5  $\mu\text{m}$ ) con base truncada nacidos en las puntas de conidióforos únicos o ramificados y fiálides pequeñas que producen conidias redondas de 3  $\mu\text{m}$ <sup>(2,3)</sup>

***Madurella grisea.*** La colonia es de crecimiento lento, temperatura óptima de desarrollo a 30°C, de color oscuro, plegada, desarrollo veloso, color canela a gris en la superficie. Las colonias en medio Sabouraud en general son estériles con la excepción de clamidoconidias. En medios de pocos nutrimentos, puede desarrollar picnidios con conidias, estructura muy similar a la producida por *Pyrenochaeta romeroi*. Existen evidencias de que estas dos especies están estrechamente relacionadas o son idénticas<sup>(2,3)</sup>

***Scedosporium apioespermum* (*Pseudoallescheria boydii*):** Los cultivos desarrollan bien a temperatura ambiente en agar Sabouraud en 5-10 días. Son colonias de aspecto veloso, seco, limitadas, en un inicio de color blanco, y posteriormente de color café claro con un pigmento del mismo color poco difusible. Presenta abundante micelio, con hifas delgadas 1-3 $\mu$ m, hialinas, septadas y con microconidias piriformes cuyo origen es de conidióforos cortos o de la hifa<sup>(1)</sup>

Las principales pruebas bioquímicas y térmicas para la diferenciación de estos microorganismos se presenta a continuación en la tabla 6.

	<b><i>M. mycetomatis</i></b>	<b><i>M. grisea</i></b>
Glucosa	Pos	Pos
Maltosa	Pos	Pos
Lactosa	Pos	Neg
Sacarosa	Neg	Pos
Gelatina (proteólisis)	Pos	Pos
Creceimiento a 37°C	+++	+
Crecimiento a 28°C	+	+++

Tabla 6: Perfil bioquímico y fisiológico para diferenciación de las especies de *Madurellas* <sup>(6)</sup>

## 1.2 Producción experimental de micetoma actino y eumicético.

La producción experimental de una enfermedad tiene como objetivo estudiar los factores fisiopatogénicos del padecimiento, para demostrar la patogenicidad de un microorganismo, toxicidad de alguna sustancia o para estudiar la respuesta frente algún medicamento.

En el caso del micetoma, es un síndrome del cual se desconoce aún mucho acerca de la patogenia, como tiempo de incubación, factores predisponentes del hospedero o de virulencia de los microorganismos entre otros, así como la susceptibilidad de estos a los medicamentos. Por estas razones, varios grupos de estudio han intentado producir micetomas experimentales.

Los actinomictomas, principalmente por *Nocardia* son relativamente fácil de reproducir en ratones. Uno de los primeros en reproducir el micetoma experimental por *N. brasiliensis*, con producción de granos fue González-Ochoa<sup>(8)</sup>, también los experimentos de Macotela-Ruiz y F.Mariat<sup>(2,8)</sup> arrojaron buenos resultados con *Nocardia*. Existen reportes de otros micetomas experimentales por otros actinomicetos como los estudios de Rippon y Peck<sup>(2)</sup> con *A. madurae* con la producción de granos<sup>(2,3,8)</sup> Sin embargo, la producción experimental del eumicetoma es realmente difícil, son muy pocos los reportes encontrados en la literatura. En general estos reportes se dividen en dos grupos: los que utilizan la estrategia de inmunosupresión y los que emplean esquemas de inoculaciones repetidas con agentes inmunoestimulantes<sup>(2,3,7,8,11,12)</sup>

Borelli<sup>(8)</sup> logró producir eumictomas con formación de granos por *M. mycetomatis* sólo si inoculaba una mezcla del hongo con otros patógenos como *H. capsulatum* y *B. dermatitidis*. Murray y cols.<sup>(8)</sup> también lograron producir granos de *M. mycetomatis* usando *Mycobacterium tuberculosis* como adyuvante y por inoculación intraperitoneal, los granos se formaron en 1 mes en el centro de lesiones granulomatosas producidas en el área entre el diafragma y el hígado<sup>(8)</sup> La desventaja de estas metodologías es el hecho de ser demasiado agresivas y que tienen que ver muy poco con la historia natural de la enfermedad.

Mahgoub<sup>(11)</sup> publicó en 1978 la producción experimental de micetomas tanto actino como eumicéticos en ratones atímicos, curiosamente la inoculación con actinomicétos (*N. brasiliensis*, *S. somaliensis*, *A. madurae* y *A. pelletieri*) arrojó resultados negativos ya que ninguno presentó ni manifestaciones clínicas de micetoma ni presencia de granos. La inoculación con *M. mycetomatis* produjo micetomas en 5 de 8 ratones atímicos. Se formaron lesiones con hifas y granos rodeados por polimorfonucleares. Los granos empezaron a formarse desde el día 9 post-inoculación. En estos granos experimentales sólo hubo presencia de hifas agregadas y de un color más pálido, en contraste con los micetomas humanos en donde los granos presentan clamidoconidias y son más pigmentados. Este es uno de los trabajos clásicos que demuestra la deficiencia en inmunidad celular para el desarrollo de micetoma<sup>(11)</sup>

Con base en este trabajo en donde fue utilizado el factor de inmunosupresión celular, se realizaron dos ensayos inmunosupresión con hidrocortisona y ciclosporina A (Capítulo 4)

Kameswara-Rao y Ram-Prasad<sup>(12)</sup>, reportaron en 1975 los resultados de sus experimentos en los que habían logrado producir granos negros de *Phialophora jeanselmei* en ratones por un método de hipersensibilidad. Realizaron 16 inoculaciones semanales subcutáneas de una emulsión del hongo en solución salina con Adyuvante Completo de Freund (ACF), al término de estas inoculaciones se realizó una última intraperitoneal. Al concluir el esquema dejaron pasar alrededor de diez semanas antes de sacrificar los animales. Algunos ratones presentaron granuloma fúngico con presencia de granos en el sitio subcutáneo de inoculación y en cavidad peritoneal, el agente etiológico también fue recobrado por cultivos de tejidos infectados en medio Sabouraud<sup>(12)</sup> Este reporte sirvió de base para realizar un ensayo de inoculaciones múltiples subcutáneas e intraperitoneales con ACF (capítulo 4)

## 1.3 Enfermedades por hongos negros.

Los hongos negros o dematiáceos incluyen un gran grupo de especies fúngicas que poseen pigmentos oscuros que van desde el verde oliva, ocre o negro. En la mayoría de los casos este pigmento es tipo melanina, en particular la 1,8-dihidroxi-naftaleno-melanina<sup>(16)</sup> Incluyen especies de hongos miceliales y levaduriformes.

Los hongos negros patógenos cuando crecen en tejido pueden presentar varias formas parasitarias. La reducción fúngica es el fenómeno que ocurre cuando el agente etiológico se presenta en su forma viable más simple, en este caso como hifas septadas, dematiáceas, estas hifas pueden estar solitarias o agregarse y compactarse para formar un "grano"<sup>(1,16)</sup>

Existen otros dos fenómenos llamados dimorfismo que ocurre cuando el hongo en su fase saprobia es micelial y la parasitaria es levadura. Ejemplos de hongos dimórficos son *H.capsulatum*, *S. shenckii*, *P. brasiliensis*, todos ellos hialinos, en los hongos dematiáceos no hay especies representativas<sup>(1)</sup>

El bifasismo que presentan algunos hongos se refiere cuando en medio de cultivo desarrollan una fase de micelio y su forma parasitaria es otra diferente a hifas y levaduras<sup>(1)</sup> En los hongos negros se presenta más el bifasismo que el dimorfismo.

Basándose en estas estructuras parasitarias, las enfermedades producidas por hongos dematiáceos incluyen el eumicetoma, la cromoblastomycosis y la feohifomicosis. En el eumicetoma los hongos sufren una reducción fúngica y se presentan sólo como elementos miceliales agregados para formar el "grano", lo cual ya fue revisado. La feohifomicosis es un término introducido por Ajello<sup>(3,15,15)</sup> para describir "infecciones de naturaleza cutánea, subcutánea o sistémica, causada por hifomicetos que en el tejido del hospedero forman hifas septadas y dematiáceas"<sup>(16)</sup>

La cromoblastomycosis será revisada en el siguiente apartado, por el momento sólo se dirá que es una enfermedad crónica caracterizada por la presencia de lesiones verrugosas e hiperplasia pseudoepiteliomatosa con granulomas tuberculoides teniendo al centro *células fumagoides* (forma parasitaria de los agentes causales de cromoblastomycosis)

En la figura 5 se presenta un esquema donde se ilustran las tres enfermedades que puede producir un hongo negro en función de la forma parasitaria presente en el hospedero <sup>(9)</sup>

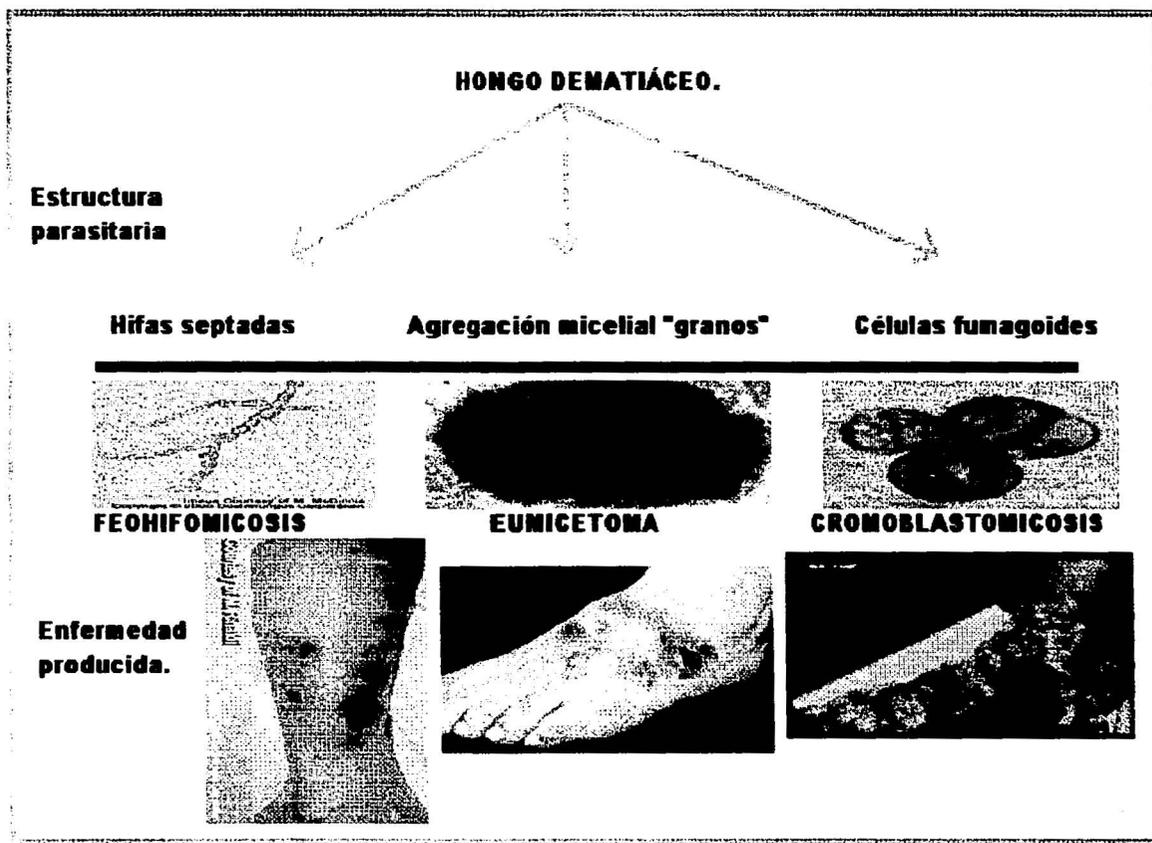


Figura 5: Espectro de enfermedades que potencialmente pueden ser producidas por los hongos dematiáceos.

Es importante mencionar que existen reportes bien fundamentados que demuestran que un hongo puede producir dos o las tres enfermedades. Como ejemplo tenemos el caso de *Phialophora verrucosa* agente etiológico bien conocido de cromoblastomycosis, en 1986 Schnading<sup>(16)</sup> reportó a este hongo como agente etiológico de una feohifomicosis en una mujer con síndrome de Cushing<sup>(16)</sup> y en 1995 se informó del primer caso de eumicetoma por *P. verrucosa*<sup>(17)</sup> Otro ejemplo es la cepa estudiada en este trabajo *Cladophialophora carrionii*, también es agente causal de cromoblastomycosis y en esta ocasión demostró como causante de micetoma.

Este fenómeno de polimorfismo lesional es característico de algunos hongos patógenos, hay datos que muestran que factores como la inmunosupresión pueden influir para el desarrollo de una u otra enfermedad, como el caso de *P. verrucosa* en individuos inmunocompetentes produce cromoblastomycosis y en inmunosuprimidos feohifomicosis; sin embargo, es muy poco lo que se conoce acerca de la fisiopatogenia de estas enfermedades y existen muchos factores que hay que estudiar como estado inmune, inoculaciones repetidas, cantidad de inóculo, cronicidad, virulencia de cepas, entre otras.

Retomando el concepto de bifasismo, estos fenotipos reducidos que presentan, células fumagoides, (Fig.8) son formas que adopta el hongo para evadir los mecanismos de resistencia del hospedero. En la gran mayoría de los casos los hongos dimórficos y bifásicos presentan una fase parasitaria monomórfica<sup>(13)</sup> En el apartado correspondiente a cromoblastomycosis se profundizará en la biología de las células fumagoides.

La identificación de los hongos dematiáceos de importancia médica es fundamentalmente por micromorfología y procesos de conidiogénesis. Adicionalmente se pueden realizar pruebas térmicas, bioquímicas (asimilación de nitrato y algunos carbohidratos) y fisiológicas (actividad proteolítica) La morfología colonial en general no es útil, ya que la mayoría tienen forma similar de colonias aterciopeladas color verde oliva, cafés o negras(Fig. 6)

Los medios de cultivo también pueden ayudar a diferenciar entre hongos negros contaminantes y patógenos, ya que casi todos los hongos de importancia médica pueden crecer en la presencia de 0.04 a 0.05% de cicloheximida y los hongos negros contaminantes tienden a ser inhibidos a estas concentraciones de antibiótico<sup>(16)</sup>

La descripción microscópica de cada una de las especies de hongos negros, se realizará en su apartado correspondiente. En este momento sólo se describirán los principales procesos de conidiogénesis involucrados en los hongos dematiáceos.

**ANÉLIDES:** Es el resultado de una conidiación progresiva-percurrente, lo cual quiere decir que la célula conidiógena crece con la producción de cada conidio, los cuales al ser liberados dejan una cicatriz anillada, anelación, alrededor de la célula conidiógena <sup>(5,16)</sup> Ejemplos de hongos negros que llevan a cabo este proceso de conidiación son el género *Exophiala sp.* y *Wangiella dermatitidis*.

**FIÁLIDES:** Son células conidiógenas que presentan una forma de botella o florero, no se altera su tamaño durante la producción de los fialoconidios y la salida de estos puede ser por una apertura simple, paralela o divergente. Los géneros que pueden ser tipificados por la forma de las fiálides son *Phialophora sp.*, *Fonsecaea sp.*(Fig.9)

**ADELOFIÁLIDES:** Se distinguen de las fiálides porque estas están separadas del septo de la hifa vegetativa, mientras que la adelofi álida nace como una extensión del septo. Pueden producir o no collaretes<sup>(16)</sup>

**POROCONIDIAS:** Este nombre designa a la conidias que proceden de un poro en la pared de la célula conidiógena. Generalmente tienen una conidiogénesis progresiva-simpodial, es decir, la célula conidiógena se arquea cada que se produce una conidia<sup>(5,16)</sup> Algunos géneros de importancia médica que presentan esta modalidad son *Curvularia sp.*, *Bipolaris*, *Exserohilum*.

Las especies del género *Cladosporium* se reproducen por conidias de origen blástico que proliferan para formar cadenas lineales, ramificadas, largas o cortas. Estas conidias son producidas a partir de un conidióforo corto, erecto, poco diferenciado, lateral o terminal, los cuales producen un gran número de blastoconidas en cadenas acrópetas ( la más joven en la parte distal de la cadena) que tienden a fracturarse para dar conidias sueltas<sup>(16)</sup>(Fig. 7)

Otro estudio que existe para el estudio de hongos negros es la prueba de exoantígenos para determinación serológica de la especie para muchos hongos negros, el inconveniente es que a falta de productos comerciales, cada laboratorio tiene que producir sus propios antisueros<sup>(16)</sup>

La tipificación de los hongos negros por los métodos tradicionales (morfología macro y microscópica, comportamiento fisiológico, bioquímico y térmico) no es del todo concluyente, precisa y exacta. En la última década, la biología molecular ha sido empleada con el objetivo de establecer las relaciones genéticas entre diferentes especies. Esta metodología nos permite saber cuando dos hongos son realmente de dos especies o géneros distintos o incluso cuando son sinamorfos. Por otra parte, también ha permitido establecer el estado telomorfo correspondiente a deuteromicetos que no se les ha encontrado su fase sexuala<sup>(29,30)</sup> En la actualidad esta metodología sólo tiene utilidad para estudios epidemiológicos y de investigación en Micología básica.

## 1.4 *Cladophialophora carrionii*, aspectos micológicos.

Los aspectos micológicos de *C. carrionii* deberían ser contemplados en la sección correspondiente a Cromoblastomycosis. Sin embargo, debido a que este trabajo se centra en el estudio de una cepa en particular de esta especie, se le dedicará un apartado especial.

Los diferentes nombres que ha tenido este hongo desde su primera descripción son *Fonsecaea pedrosoi* var. *Cladosporium* por Simson, 1946; *Fonsecaea cladosporium* por Powell, 1952; *Cladophialophora ajelloi* por Borelli en 1980<sup>(3)</sup>

Es importante mencionar que *C. carrionii* forma parte de un conjunto de hongos dematiáceos productores de cromoblastomycosis, los cuales están genéticamente muy relacionados debido a que su forma parasitaria de todos ellos es indistinguible, además, bajo diferentes medios, todos ellos comparten la capacidad de producir fiálides con fialoconidias en su fase saprofita<sup>(3)</sup>

Fue Borelli en 1980<sup>(3)</sup> quién estudió una cepa de un agente de cromoblastomycosis proveniente de Uganda, el hongo produjo numerosas fiálides con collaretes además de las estructuras típicas del género *Cladosporium*. En base en estas observaciones, él estableció el nuevo género llamado *Cladophialophora* y a la cepa en estudio la llamó *Cladophialophora ajelloi*. Honbo et al.<sup>(3)</sup> más tarde encontraron que muchas cepas aisladas de *C. carrionii* producían fiálides cuando se cultivan en medios nutricionalmente deficientes y se encontró indistinguible de *Cladophialophora ajelloi*. Estas observaciones forzaron a Honbo a concluir que *C. ajelloi* es un sinamorfo de *C. carrionii*; sin embargo, las fiálides producidas por *C. carrionii* son inestables y tienden a perderse durante las resiembras<sup>(3)</sup>

Estudios de biología molecular basados en RNA ribosomal (rRNA) comprobaron que *C. carrionii* y *C. ajelloi* tienen secuencias genómicas idénticas<sup>(30)</sup> Además comprobaron la gran relación genética entre *C. carrionii* y *Phialophora verrucosa*<sup>(3,29,30)</sup>

De Hoog<sup>(28)</sup> publica un extenso estudio sobre la taxonomía de los hongos patógenos del humano de los géneros *Cladosporium* y *Xylohypha* basándose en su fisiología nutricional. En este estudio, menciona cuales son las características necesarias para que un hongo quede clasificado dentro del género *Cladophialophora*<sup>(28)</sup> Dichas características bioquímicas y fisiológicas se resumen en la tabla 7:

Perfil bioquímico y fisiológico del género <i>Cladophialophora</i> <sup>(28)</sup>	
Asimilación	Lactosa, nitrato, creatina, creatinina, etanol
Fermentación de carbohidratos	Negativo
Ciclohexamida 1%	Resistente
Ureasa	Positivo
Producción de sust. amiloideas	Negativo
Hidrólisis de gelatina	Negativo
Desarrollo en medio con >10%NaCl	Negativo

TABLA 7. Perfil bioquímico y fisiológico del género *Cladophialophora*<sup>(28)</sup>

A la fecha, no ha sido encontrada la fase perfecta, telomorfa, de *Cladophialophora carrionii*, sin embargo estudios de rRNA han demostrado que el ascomiceto *Capronia pilosella* comparte hasta un 96% de secuencia genómica con *Cladophialophora carrionii*. *Ca. pilosella* también es un hongo dematiáceo, que produce conidas catenuladas, su perfil bioquímico y fisiológico es muy similar al de *Cladophialophora carrionii*, por lo que se llega a la conclusión que es su estado telomorfo<sup>(28,30)</sup>

Los agentes etiológicos de la cromoblastomicosis, están relacionados con varios climas. El género *Fonsecaea* se asocia principalmente a climas tropicales y subtropicales, sin embargo *Cladophialophora carrionii*, se encuentra relacionado con zonas áridas y secas. Existen reportes del aislamiento del hongo en Venezuela, África del sur, Australia y existe un solo reporte de su aislamiento en México<sup>(36)</sup> Existe un estudio sobre el aislamiento de *Cladophialophora carrionii* a partir de vegetación xerófila y de cactáceas. En el tejido de estas plantas, el hongo se encuentra formando estructuras muy parecidas a las células fumagoides<sup>(19)</sup>

Cuando *C. carrionii* es cultivado en agar Sabouraud e incubado a 25°C se obtienen colonias de tamaño limitado entre 4-6cm de diámetro con bordes regulares. Al término de 3 a 4 semanas. Las colonias son de color verde oliva muy oscuro o hasta negras, con un pigmento dematiáceo poco difusible al medio(Fig. 6)

Microscópicamente produce cadenas largas y ramificadas de conidias blásticas-acrópetas (disposición en *Cladosporium*), sobre un conidióforo poco diferenciados o en la parte apical de la hifa. Las conidias son elípticas su tamaño varía de 2-4  $\mu\text{m}$  por 3 a 6  $\mu\text{m}$ <sup>(1-3)</sup> (Fig 7) Muchas cepas aisladas de *C. carrionii* producían fiálides cuando se cultivan en medios nutricionalmente deficientes como lactrimel o harina de maíz. Estas fiálides, son producidas a partir de conidias intercalares o terminales de las cadenas del *cladosporium*, las fialoconidias producidas por estas estructuras son hialinas, lisas, subglobosas a elípticas de 1.5 – 2.0  $\mu\text{m}$  de ancho y de 2.0 – 3.0  $\mu\text{m}$  de largo, y se encuentran acumuladas en la punta de la fiálide en forma botriosa (racimos)<sup>(3)</sup>

Es muy importante diferenciar *C. carrionii* de las especies saprobias de *Cladosporium sp.* y de *Cladophialophora bantianum* y *Cladosporium trichoides*, agentes etiológicos de feohifomicosis. En la tabla 8 se encuentra las principales diferencias fisiológicas y morfológicas<sup>(1-3,28,30)</sup>

Característica	<i>C. bantianum</i>	<i>C. trichoides</i>	<i>C. carrionii</i>	<i>Cladosporium sp.</i>
Cadena de conidios	5 a 10	8 a 25	8 a 16	3-4
Comportamiento Térmico	T.O: 30°C Crece a 14°C >37°C crecimiento muy lento.	T.O: 37°C Desarrollo a 42-43°C	T.O: 30°C > 37°C crecimiento muy lento.	T.O: 25°C
Respuesta a la ciclohexamida	Resistente	Resistente	Resistente	Sensible
Hidrólisis de Caseína	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
Hidrólisis de Gelatina	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
Afinidad por tejido	Neurotrópico	Neurotrópico	Dermotrópico	Ninguno
Conidiación	Conidias de 4 -6 por 7 a 17 µm Conidióforo poco diferenciado	Conidias de 2-4 por 4-18 µm	Conidias de 2- 4 por 3-7 µm Producción de fiálides	Conidias de 2-4 por 4-5 µm

Tabla 8: Criterios de diferenciación entre *C. trichoides*, *C. bantianum*, *C. carrionii* y *Cladosporium sp.*

## 1.5 Cromoblastomicosis.

### Definición.

Es una micosis de curso crónico que presenta lesiones verrugosas, afecta la piel y tejido subcutáneo producida por un grupo de hongos dematiáceos pertenecientes a los géneros *Fonsecaea*, *Phialophora*, y *Cladophialophora*, que en tejido presentan una forma parasitaria de células redondas de pared gruesa, color ocre que pueden encontrarse solas o agrupadas y a veces septadas<sup>(1-5,14)</sup>

También es conocida con el nombre de dermatitis verrugosa, enfermedad de Fonseca.

### Epidemiología.

Predomina en regiones tropicales y subtropicales de América y África. En América los países con zonas altamente endémicas son Brasil, Costa Rica, Cuba, Centro América, Venezuela, México ( zona de la Huasteca, sur de Veracruz, Tabasco, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán)<sup>(1)</sup>

Esta enfermedad se presenta con mayor frecuencia entre los 30 y 50 años de edad, con una preferencia en el sexo masculino de 4:1. La principal ocupación relacionada son las labores de campo donde se esta en contacto con lodo, madera, detritus vegetal<sup>(1-5)</sup>

### Etiopatogenia.

Al igual que en las otras micosis subcutáneas, la cromoblastomicosis se inicia por un traumatismo con material contaminado con conidias e hifas del hongo, de esta manera alcanza el tejido cutáneo que es donde se establece y se forman las formas parasitarias llamadas células fumagoides(Fig. 8)<sup>(1-5)</sup>

Esta micosis es producida por un grupo de hongos negros. Las especies más frecuentes son: <sup>(1-4, 19)</sup>

<b>AGENTE ETIOLÓGICO</b>	<b>CLIMA RELACIONADO.</b>
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Tropical-Subtropical. <b><u>Especie más frecuentemente aislada en México.</u></b>
<i>Fonsecaea compacta</i>	Tropical-Subtropical.
<i>Rhinocladiella aquaspersa</i>	Tropical-Subtropical.
<i>Wangiella dermatitidis</i>	Tropical-Subtropical.
<i>Phialophora verrucosa</i>	Templado.
<i>Cladophialophora carrionii</i>	Árido-cálido

### **Aspectos clínicos.**

La región anatómica más afectada son las extremidades inferiores, seguida de las superiores y en mucho menor frecuencia en tronco.

La primera lesión se presenta en el sitio donde ocurrió el traumatismo, al comienzo es una lesión pequeña, elevada, eritematosa, con pápulas no pruriginosas. Con frecuencia las lesiones son escamosas. Con el tiempo, meses o años, las lesiones toman una distribución siguiendo trayectos linfáticos locales, con frecuencia se elevan de 2 -4mm sobre la superficie de la piel y son hipertróficas, con superficie escamosa, opacas, ulceradas, y costras hemáticas. En este grado, las lesiones por lo general ya cubren regiones de varios centímetros, las lesiones verrugosas toman el aspecto de "colifor", o son planas y superficiales como placas de psoriasis. Estas lesiones con la cronicidad van dejando zonas cicatrizantes, acromiantes y atróficas(Fig. 5)<sup>(1,2)</sup>

## **Diagnóstico de laboratorio.**

Tanto en el examen directo como en la histología se pueden encontrar fácilmente las estructuras parasitarias que confirman el diagnóstico, pero es importante realizar cultivos para identificar la especie.

Examen directo: En las muestras obtenidas de las lesiones escamosas, principalmente de los puntos negros, aclaradas con KOH 20%, se observa la forma parasitaria del agente etiológico, las células fumagoides, células color café, redondas u ovals de 4 a 12  $\mu\text{m}$ , de pared gruesa de doble vista, a veces divididas por septos, pueden encontrarse solas o en grupo. Si la muestra es de una zona muy superficial, las células fumagoides pueden encontrarse produciendo hifas dematiáceas, anchas y tabicadas. Todos los agentes etiológicos de cromoblastomicosis presentan la misma forma parasitaria. La presencia de las células fumagoides es patognomónico de la enfermedad<sup>(1,3)</sup>(Fig. 8)

Cultivos: Pueden ser cultivados en medio de Sabouraud y micosel. Desarrollan bien a 25°C y tardan entre 3 y 4 semanas para la obtención de cultivos maduros. Las colonias de los diversos agentes etiológicos son muy parecidas entre sí, son aterciopeladas, cubiertas por vello blanco, color verde olivo a negro y con pigmento dematiáceo difusible al medio. Por esta razón, la identificación en forma rutinaria se realiza por la micromorfología, estructuras de reproducción y procesos de conidiogénesis<sup>(1,2)</sup>(Fig. 6)

Biopsia: Es característico de la cromoblastomicosis presencia de hiperplasia pseudoepiteliomatosa al nivel de la epidermis, además de hiperqueratosis, espongiosis, acantosis y paraqueratosis. La acantosis parece ser una respuesta celular a los hongos contenidos en los microabscesos y se ha denominado eliminación transepitelial<sup>(2,14)</sup> al nivel de la dermis, desde superficial hasta profunda se encuentran infiltrados compuestos de una mezcla de histiocitos, células gigantes, linfocitos, plasmocitos y algunos netutrofilos, formando granulomas tuberculoides, donde al centro se encuentran las células fumagoides. También hay presencia de fibrosis<sup>(1-3,29)</sup>(Fig. 8)

## **Tratamiento.**

Los casos iniciales o las lesiones muy limitadas tienen muy buena respuesta a la escisión quirúrgica, con un amplio rango de tejido sano.

Respecto a los antifúngicos, existen respuestas bajas y muy variables. El antifúngico con mayor eficacia reportada es la 5-fluorocitosina a dosis de 50-150 mg /Kg día dividido en 4 dosis. Para casos con lesiones muy extensas, la combinación con anfotericina-B intravenosa da resultados muy exitosos. El inconveniente, es la falta de 5-fluorocitosina en México<sup>(1,3)</sup>

Entre los antifúngicos azólicos, el Itraconazol, tiene resultados muy variables. Se ha observado que las cepas de *C. carrionii* son más sensibles que las especies de *Fonsecaea pedrosoi*. Con otros medicamentos como fluconazol y terbinafina no existe amplia experiencia con su uso.

## **Micología de los agentes etiológicos.**

Indiscutiblemente, los principales agentes de la cromoblastomicosis están muy cercanamente relacionados, debido a que sus formas parasitarias son indistinguibles y comparten la capacidad para formar fialoconidias en su estado saprobio<sup>(3)</sup>

Como ya fue mencionado, las características macroscópicas de las colonias de los diversos agentes etiológicos de cromoblastomicosis, son todas muy similares y se describen como colonias de lento crecimiento, desarrollo entre 30 y 37°C, de aspecto veloso de color verde oliva oscura, pardas o negras, con el crecimiento de un vello gris en la superficie y con pigmento negro difusible al medio<sup>(1-4)</sup> Por lo tanto, sólo serán descritas las características micromorfológicas, particulares de cada especie.

***Phialophora verrucosa***: La única forma de reproducción es por fiálides de 3 -4  $\mu\text{m}$  por 4-7  $\mu\text{m}$ , con collaretes. Estas estructuras se localizan en forma lateral o en la parte apical de la hifa. Los fialoconidias redondas de 1-3  $\mu\text{m}$  de diámetro. Son producidas en sucesión, pero no se presentan catenuladas, están rodeados de una sustancia adhesiva, de modo que se forman cúmulos en el collarete de la fiálide<sup>(1-3)</sup> (Fig.9)

***Cladophialophora carrionii***: Todo lo correspondiente a los aspectos micológicos de esta especie son tratados en el apartado 1.4(Fig. 7)

***Rhinocladiella aquaspersa***: Produce conidióforos de pared delgada y bien definida, erectos, produce conidias solamente en la parte superior. La conidiogénesis es progresiva-símpodial (las conidias crecen alternadas a ambos lados de la célula conidiógena, la cual crece y se arquea con cada conidiación) Las conidias son elípticas de 2 -5 $\mu\text{m}$  color café pálido, las cuales se pueden presentar en cúmulos alrededor de la célula conidiógena<sup>(1-3)</sup> (Fig.9)

***Fonsecaea pedrosoi***: Presenta los tres tipos de conidiación, de los tres agentes anteriores, en forma de *Cladosporium*, *Rhinocladiella* y por fiálides. La disposición en *Cladosporium* presentada por las especies del género *Fonsecaea* es de cadenas muy cortas. Aunque prácticamente todos las cepas aisladas de *Fonsecaea pedrosoi* producen fiálides, éstas se encuentran en poca cantidad y tienden a perderse durante las resiembras<sup>(1-3)</sup> (Fig.9)

## **Estudios biológicos sobre el dimorfismo de los agentes de la cromoblastomycosis.**

La fase parasitaria de todos estos hongos son prácticamente la misma, las células fumagoides, células color café, redondas u ovals de 4 a 12  $\mu\text{m}$ , de pared gruesa de doble vista, a veces divididas por septos, pueden encontrarse solas o en grupo. Es importante mencionar que estas células no se reproducen por gemación, como las levaduras, más bien se dividen por fisión binaria y tienen un crecimiento isotrópico <sup>(1-4,13,14)</sup>(Fig.8)

La cromoblastomycosis es un padecimiento crónico, y las células fumagoides forman verdaderos granulomas tuberculoideos, los cuales producen un medio ácido, anaerobiosis y fibrosis, condiciones muy adversas para el desarrollo de cualquier microorganismo, sin embargo, las células fumagoides tienen la capacidad de crecer en estas condiciones por largos periodos de tiempo<sup>(13)</sup>

Estos fenotipos reducidos, pueden empezar a formarse a partir de cualquier parte de la hifa (lateral o apical), la formación involucra el alargamiento gradual del septo para formar cuerpos ovoides de 8-15 $\mu\text{m}$ . La pared en un inicio es delgada y se engruesa con el tiempo. En un inicio son unicelulares, posteriormente se forman septos<sup>(13)</sup>

Con el fin de estudiar las condiciones en las cuales se producen las células fumagoides, se han realizado muchos estudios *in vitro*, no han sido muy concluyentes, pero si se sabe que el dimorfismo de estos agentes esta en función del pH, nutrimentos y oligoelementos. La ausencia de  $\text{Mn}^{2+}$ , el medio fuertemente ácido (pH 2.5-4) son condiciones que favorecen el desarrollo de las estructuras parasitarias<sup>(3,13)</sup>

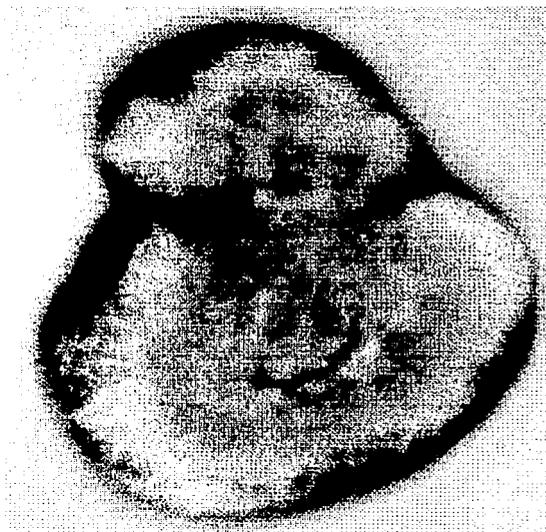


FIG. 6 Colonia de *C. carrionii*, agar Sabouraud, 15d, 25°C.

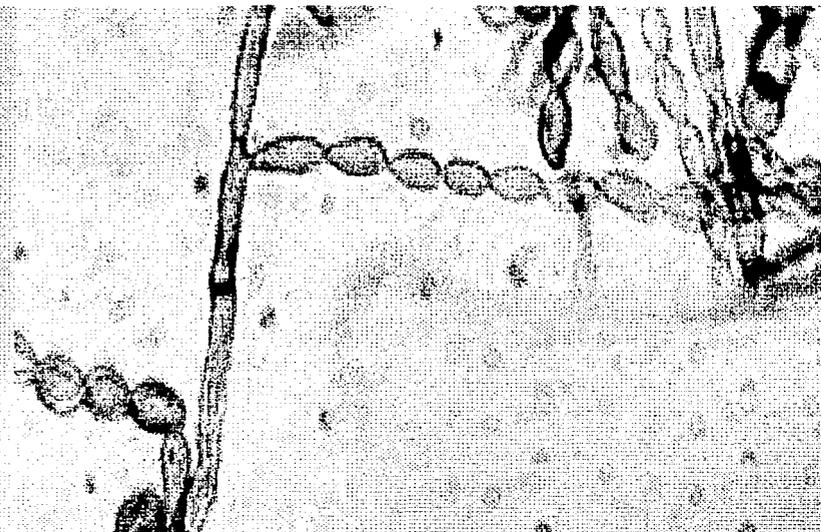


FIG. 7 *C. carrionii*, se observan las hifas dematiáceas y septadas, también se aprecian las microconidas en cadena larga y la forma elíptica de éstas (40x)

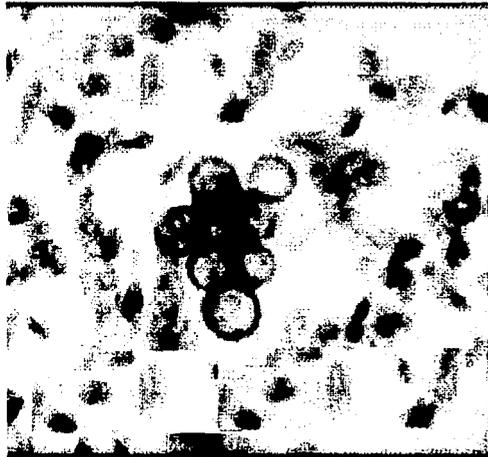


FIG. 8 Células fumagoides en tejido, forma parasitaria de los agentes de la cromoblastomycosis

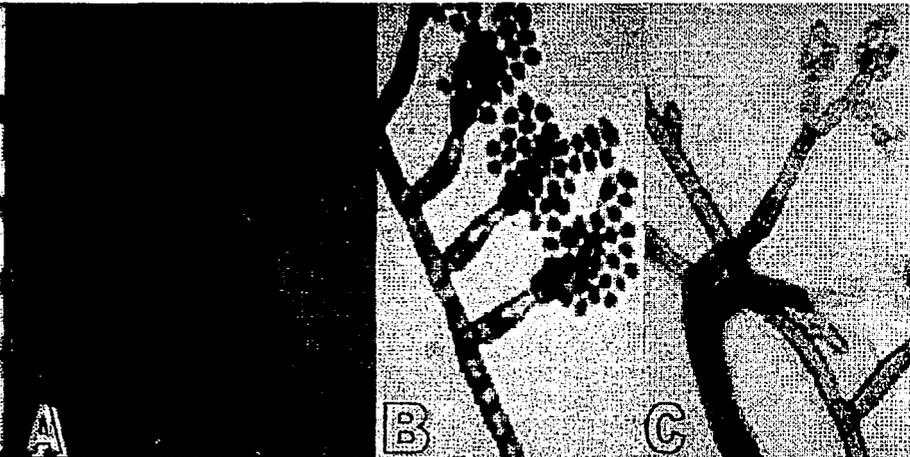


FIG. 9 Tres de los principales agentes etiológicos de cromoblastomycosis (A) *F. pedrosoi*, (B) *P. verrucosa*, (C) *R. aquaspersa*.

## 1.6 Feohifomicosis.

### Generalidades.

El término de feohifomicosis fue introducido por Ajello<sup>(16)</sup> en 1974, para describir las infecciones de naturaleza cutánea, subcutánea y sistémicas causadas por un amplio grupo de hifomicetos, que desarrollan en tejido elementos miceliales de pared oscura, dematiáceos y septados<sup>(16)</sup>

La feohifomicosis, puede ser dividida basándose en el tejido involucrado, de esta manera tenemos a las superficiales: tiña negra, onicomycosis, piedra negra, subcutáneas: invasión a tejido celular subcutáneo, y sistémicas en forma de abscesos pulmonares y cerebrales<sup>(1,3,16)</sup> Sin embargo, bajo el término de feohifomicosis se consideran sólo los casos subcutáneos y sistémicos<sup>(3)</sup> Es considerada una micosis oportunista<sup>(1,3)</sup>

### Etiología.

Los agentes etiológicos de la feohifomicosis, incluyen una gran lista de hongos que tienen en común la producción de melanina en la pared celular del hongo, tanto en el cultivo como en el tejido del hospedero<sup>(3)</sup>

Considerando sólo los casos subcutáneos y sistémicos, la lista de agentes causales incluye cerca de 60 especies, incluidas en 28 géneros diferentes, siendo de los más importantes *Cladosporium*, *Cladophialophora*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Exophiala*, *Lecythophora*, *Nigrospora*, *Phialophora*, *Scytalidium*, *Ulocladium*, etc.

Estos hongos muy frecuentemente son aislados del ambiente, presentes en lodos, madera, asociados a plantas. Otros son aislados del aire<sup>(1,3,15)</sup>

## **Epidemiología.**

La feohifomicosis subcutánea tiene distribución mundial, se presenta en lugares de clima tropical, subtropical y templado <sup>(3)</sup> Los pacientes en general presentan alguna enfermedad debilitante o inmunodeficiencia. Los pacientes sanos, presentan una historia de exposición prolongada por años en el hábitat de los agentes etiológicos <sup>(3)</sup> El hongo más relacionado con esta variedad clínica es *Exophiala jeanselmei*. La vía de entrada es la inoculación traumática con materiales contaminados con el hongo <sup>(3)</sup>

La variedad cerebral, también tiene ha sido reportada en casi todo el mundo. Los agentes etiológicos más frecuentes son *Cladosporium trichoides*, *C. bantianum*, *E. dermatitidis* Existe evidencia de que la vía de entrada de *C. trichoides* es por inhalación <sup>(3)</sup>

En ambas enfermedades, no existe influencia racial ni de sexo. Han sido reportadas en todas las edades, predominando la tercera y quinta década de la vida <sup>(1,3)</sup>

## **Feohifomicosis del Sistema Nervioso Central.**

Los síntomas que presenta el paciente son compatibles con absceso cerebral bacteriano, como dolor de cabeza con duración de semanas o meses, seguido por convulsiones, signos neurológicos. En forma más crónica se presenta letargo, confusión, estupor y finalmente coma <sup>(3)</sup>

Las lesiones en la corteza cerebral pueden ser únicas y algunas encapsuladas o múltiples y menos circunscritas. La localización más común es frontal o lateral. El centro de la lesión es necrótico, los elementos fúngicos están presentes en el pus verde amarillento. En tinciones de H&E se encuentran en forma abundante las hifas de color café claro, septadas, a veces ramificadas, solitarias o en grupo. La respuesta inflamatoria es tanto piógena como granulomatosa. Predominan neutrofilos en áreas necróticas, también hay presencia de células gigantes que en ocasiones contienen segmentos de hifas. Alrededor de las áreas necróticas están los linfocitos e histiocitos. Puede estar presente una cápsula fibrótica.

La cirugía es la mejor opción terapéutica. La extracción quirúrgica de las lesiones bien localizadas ha resultado con buen resultado en largo plazo, al contrario de cuando no es retirada completamente la lesión<sup>(1,3)</sup>

## **Feohifomicosis Subcutánea.**

Las lesiones iniciales son pequeñas, las cuales se van agrandando, se fusionan y forman una sola cavidad. Con el tiempo, una banda periférica de tejido fibroso, rodea el absceso formando el llamado *quiste*. En general la epidermis, no se afecta, las lesiones permanecen pegadas a la piel y no invaden ni músculo, ni hueso. Las lesiones permanecen muy localizadas y la inflamación local es de bajo grado, la diseminación linfática y hematógena es rara. El promedio de las lesiones encapsuladas es de 8mm<sup>(3)</sup> La principal localización son las extremidades, seguidas de cuello, cara y espalda.

La mayoría de las lesiones tienen abscesos fusionados o solitarios, en el centro están formados por neutrofilos y una banda periférica de tejido fibroso. Los márgenes de estos abscesos y la totalidad del granuloma esta compuesto de células gigantes, epitelioides, histiocitos, plasmocitos y linfocitos. Los elementos fúngicos son encontrados predominantemente en o junto a las áreas purulentas, como hifas dematiáceas, septadas y en ocasiones ramificadas, algunas veces los hongos son encontrados en grupos de hifas en el pus, estos agregados no son tan densos como los granos del micetoma. En muchas ocasiones, en la lesión se encuentran las espinas o artefactos que produjeron la inoculación del hongo<sup>(3,5)</sup>(Fig.10)

Definitivamente la escisión quirúrgica es la mejor opción terapéutica. En lesiones localizadas se prefiere la extirpación quirúrgica o el uso de criocirugía, 5-fluorocitosina, anfotericina B, o los derivados azólicos. En los casos recalcitrantes se ha empleado itraconazol a dosis y tiempos muy variados( 50-600 mg/día, por 1 a 48 meses) con respuestas variables. El tiempo de los tratamientos se encontrará determinado por el grado de inmunocompromiso, el sitio y la extensión de la afección y agente causal<sup>(3,5,15)</sup>

## Micología de los principales agentes etiológicos.

La muestra más importante para la realización del cultivo, es la debridación quirúrgica, los agentes etiológicos no han sido aislados de algún otro fluido biológico como líquido cefalorraquídeo, esputo, etc. Los cultivos se realizan en agar de Sabouraud, extracto de malta o papa dextrosa, la incubación se realiza a 30°-37°C por 10 a 20 días<sup>(3)</sup>

***Cladosporium bantianum***: La colonia es de color negro con textura aterciopelada. En la micromorfología, *C. bantianum* produce conidias lisas de color café, elípticas que miden en promedio de 4.6 por 10 µm, dispuestas en cadenas, las cuales tienen muy pocas ramificaciones y son producidas directamente de la punta o parte lateral de la hifa, o sobre conidióforos, los cuales están muy poco diferenciados. Las cadenas de conidias generalmente están formadas por 5 a 10 conidias, pero hay pocas cadenas de más de 20 conidias<sup>(3)</sup>

***Cladosporium trichoides***: Un antiguo nombre de este hongo es *Xylohypha bantiana*. Sin embargo, estudios recientes de *Xylohypha nigrescens*, han demostrado que esta especie no produce hifas dematiáceas y estudios de microscopía electrónica muestran diferencias en la conidiogénesis entre *X. nigrescens* y *C. trichoides*<sup>(3)</sup>

El hongo desarrolla mejor cultivado en agar papa-dextrosa o extracto de malta a 25°C, crece en promedio en tres semanas. Es resistente a la ciclohexamida. El color de la colonia varía de gris -oliva a café o verde muy oscuro, la superficie de la colonia es aterciopelada, y puede o no presentar pliegues en el centro. El reverso de la colonia es negro<sup>(3)</sup>

Respecto a sus estructuras de reproducción, *C. trichoides*, produce cadenas de conidias principalmente largas y ramificadas sobre conidióforos pobremente diferenciados. Generalmente las cadenas de conidias se producen directamente de la punta o la parte lateral de la hifa. El ancho de la conidia dentro de la misma cadena es muy uniforme. Conidias maduras se muestran café pálido, miden de 2- 4 µm de ancho y entre 4 y 18 µm de longitud, varía dependiendo de la

posición de la cadena. Las primeras conidias proximales al conidióforo, son frecuentemente varias veces más largas que las conidias distales del conidióforo. Las conidias son unicelulares y alargadas, elípticas con una base truncada. El número de conidias por cadena varía de 4 a 40, pero generalmente se encuentra entre 8 y 25<sup>(3)</sup>

Las características diferenciales entre estas dos últimas especies y *Cladophialophora carrionii* se encuentran en el apartado 1.4

***Exophiala janselmei***. En los primoaislamientos, las colonias son negras y viscosas con muchas células levaduriformes, que se encuentran gemando, presentan anelaciones. En estas colonias levaduriformes, se pueden encontrar cúmulos de conidias en forma botriosa que salen directamente de la hifa. Esta fase del hongo se llama *Phaeoannelomyces elegans*. La colonia con el tiempo gradualmente se expande y se vuelve micelial y se cubre con hifas aéreas con apariencia aterciopelada.

Las hifas son septadas, lisas, de color café y producen conidióforos ramificados en forma lateral o en la punta de la hifa. La célula conidiógena es café, cilíndrica con anélides. Las conidias son unicelulares, lisas, hialinas, de forma elíptica a cilíndricas y miden de 1-3 por 1-6  $\mu\text{m}$ , forman agregaciones en masa que tienden hacia abajo del conidióforo o de la hifa<sup>(3)</sup> Esta especie es indistinguible morfológicamente y fisiológicamente de *E. gougerotii*.(Fig.1)

***Exophiala dermatitidis***. Los primo-aislamientos producen colonias negras, húmedas y viscosas. Los sub-cultivos producen colonias con hifas aéreas. En las colonias viscosas predominan las células levaduriformes gemantes. Los aislamientos primarios pueden producir fiálides con collaretes tipo *Phialophora*. Cuando ya es producido el micelio aéreo, las células levaduriformes disminuyen, se encuentran conidióforos tipo *Cladosporium*. Los conidióforos frecuentemente aparecen cadenas de células alargadas. Las conidias se acumulan cerca del extremo de la célula conidiógena. Esta especie, tiene la capacidad de crecer a 40°C<sup>(3)</sup> (Fig 10)

***Exophiala spinifera***: Al inicio es una colonia negra, húmeda, levaduriforme, crece bien a 30°C. Se observan células gemantes de 2.5- 3.5 por 3- 6 µm y cadenas de levaduras predominantemente, se producen muy pocas hifas, las cuales van predominando con el tiempo.

Los conidióforos son muy largos de 35 a 60 µm, son simples o ramificados, oscuros, rígidos y lisos, recuerdan la imagen de una espina. Las células conidiógenas presentan anelaciones, miden de 1.6- 2.7 por 5-12µm. Las conidias son unicelulares, de forma ovales a elípticas, hialinas, lisas y miden de 1 -3 por 2-4 µm, se agregan en masas en forma esférica en la punta del conidióforo<sup>(3)</sup>

***Phialophora richardsiae***: Crece rápidamente en agar de Sabouraud a 30°C. El color de la colonia varia del pardo -oliva al pardo -grisáceo, con zonas concéntricas. Conforme las colonias maduran, producen un pigmento pardo difusible. La superficie de la colonia es lanosa con hifas aéreas cortas. En un inicio el micelio es hialino, pero a los 3 a 4 días se pigmenta café oscuro<sup>(3)</sup>

Las células conidiógenas son fiálides y tienen una gran variedad de tamaño y morfología. Las fiálides son producidas directamente de la hifa, miden de 1-3 µm de ancho por la base y de 2 -30 µm de largo, con una punta muy angosta. Las fiálides simples producen fialoconidias incoloras de pared delgada, elípticas de 1 -2 por 2-4 µm, y las fiálides con collaretes producen conidias esféricas de 2.5 -3.0 µm de diámetro, de color café<sup>(3)</sup> (Fig. 10)

## 1.7 Producción experimental de cromo y feohifomicosis.

Uno de los principales motivos para realizar producción experimental de cromoblastomicosis y feohifomicosis es realizar ensayos con antimicóticos, ya que varios de los hongos involucrados son resistentes o insensibles a los antimicóticos de uso común y los estudios *in vivo* ofrecen resultados más confiables que los estudios *in vitro*, ya que en estos últimos no son tomados en cuenta los factores del hospedero (inmunidad, penetración del medicamento, etc) Otros motivos son estudiar aspectos biológicos del dimorfismo de los hongos, o el estudio de la etiopatogenia de estas enfermedades<sup>(21)</sup>

El estudio modelo para la producción experimental de cromoblastomicosis fue realizado por Borrelli <sup>(3)</sup> en 1972, reportó que inoculaciones intraperitoneales de *C. carrionii* y *F. pedrosoi* en ratones recién nacidos (una semana de edad) pueden producir nódulos negros en la cola, articulaciones, escroto o cara después de un mes de la inoculación. Algunos nódulos pueden ulcerar más tarde y curar lenta y espontáneamente. Los exudados de estos nódulos contienen las células fumagoides. La inoculación intravenosa de conidias de *F. pedrosoi* pueden producir una variedad de lesiones y ocasionalmente infección sistémica<sup>(3)</sup>

Kwon-Chung<sup>(3)</sup> concluye que las ratas y ratones adultos inmunocompetentes, son en la mayoría de los casos susceptibles a infección experimental, pero cuando se inocula la suspensión de conidias resulta sólo en la formación de abscesos, y las lesiones crónicas, verrugosas o papilomatosas, usualmente no llegan a ser producidas debido a que el absceso rompe espontáneamente y cura<sup>(3)</sup>

Respecto a la feohifomicosis, existe un número mayor de trabajos exitosos en la producción experimental de la enfermedad tanto cutánea como sistémica. En la mayoría de ellos el factor común fue trabajar con animales con alguna inmunosupresión, hecho que confirma el carácter oportunista de la feohifomicosis <sup>(22)</sup> A manera de

ejemplo, se presenta el resumen de dos trabajos en donde se trabajó con *C. trichoides* y *C. bantianum*

Nishimura y Miyaji<sup>(22)</sup> produjeron feohifomicosis por inoculación intravenosa de un inóculo de conidias de *Cladosporium trichoides* en una concentración 1.0%, en ratones atímicos *nu/nu* comparados contra heterocigotos *nu/+* y BALB/c eutímicos *+/+*. Al término de 30 días fueron encontradas lesiones fúngicas en cerebro, los ratones homocigotos atímicos *nu/nu* fueron los más susceptibles. La forma parasitaria del hongo en el cerebro fue de hifas delgadas, septadas, pigmentadas, que presentaron un infiltrado de polimorfonucleares<sup>(22)</sup>

Maheswari<sup>(26)</sup> utilizó una cepa de un hongo negro aislada de una lesión cutánea de un paciente. La cepa fue tipificada como *C. bantianum*, se prepararon inóculos del hongo y fueron inoculados en ratones por vía intravenosa y en conejos en forma subcutánea. En los primeros, causó enfermedad sistémica produciendo la muerte de los ratones en menos de 20 días y la cepa fue recobrada y observada en hígado, bazo, riñones y pulmones en forma de hifas septadas, ramificadas y dematiáceas. En el ensayo subcutáneo, alrededor del sitio de inoculación se produjeron lesiones, de las cuales se observaron filamentos dematiáceos y células esféricas en grupos. Se produjo diseminación ya que en el conejo el hongo fue observado en bazo y cerebro<sup>(26)</sup>

## 1.8 Justificación del tratamiento inmunosupresor.

En los apartados correspondientes a la producción experimental de micetoma, cromoblastomicosis y feohifomicosis, fue mencionado que en varios modelos experimentales se trabajaban con ratones inmunosuprimidos para lograr la reproducción de las enfermedades. En algunos estudios la inmunosupresión fue lograda con la administración de hidrocortisona, y en otros estudios utilizando ratones atímicos homocigotos *nu/nu* o heterocigotos *nu/+*<sup>(7,8,11,23-25)</sup>

En el ensayo A de este trabajo, el tratamiento inmunosupresor fue hidrocortisona a la dosis correspondiente, 0.5mg/kg de peso, por vía intraperitoneal. En un inicio se consideró que este tratamiento podría ser suficiente para lograr la enfermedad, sin embargo como no se obtuvieron los resultados esperados se optó por cambiar el esquema de inmunosupresión.

En los ratones atímicos, se presenta una disminución en la respuesta inmune celular específica mediada por linfocitos T, ya que al no tener sitio de maduración, estas células no son funcionales. Según el trabajo de E.S Mahgoub<sup>(11)</sup>, la producción de eumicetomas sólo puede ser logrado en ratones atímicos<sup>(11)</sup> Trabajar con estos ratones es sumamente difícil, ya que se requieren de áreas y equipo estéril, además de estas cepas de ratones no son fáciles de conseguir. Por estos motivos, se trató de simular con algún medicamento, una inmunosupresión similar a la de un ratón atímico.

La ciclosporina A fue seleccionada para este ensayo, debido a que este fármaco disminuye la inmunidad celular mediada por linfocitos T CD4, al inhibir la síntesis de Interleucina-2 ( IL-2) Citocina necesaria para activar toda la maquinaria de la inmunidad celular mediada por linfocitos T<sup>(39)</sup>

El medicamento fue administrado a la dosis más alta, recomendada para pacientes de trasplantes, 15mg/kg peso, y fue administrado por vía oral con todas las indicaciones pertinentes<sup>(40)</sup>(Apéndice)

Respecto al uso de terapias inmunosupresoras es necesario tomar en cuenta los siguientes puntos:

1. La respuesta inmunológica primaria inicial se puede suprimir con mayor facilidad y eficacia que una respuesta secundaria<sup>(39)</sup>
2. Existe una mayor probabilidad de que la respuesta inmunológica se inhiba con la terapia inmunosupresora, si ésta comienza antes de la exposición al inmunógeno, en vez de una vez ocurrida ésta<sup>(39)</sup>

Por último, el Adyuvante Completo de Freund, al contrario de inmunosuprimir es un inmunoestimulante, que favorece la eliminación de los patógenos. Sin embargo, fue utilizado en el ensayo B para tratar de reproducir lo reportado por Kameswara<sup>(12)</sup>

---

## Capítulo 2:

### Objetivos.

---

#### **OBJETIVO PRIMARIO:**

1. Cumplir los postulados de Koch, comprobando la capacidad de la cepa de *C. carrionii* en estudio, para producir *granos* en un modelo murino.

#### **OBJETIVOS SECUNDARIOS:**

1. Estudiar la influencia de la inmunosupresión en el desarrollo dermatrópico de *C. carrionii* en un modelo murino.
2. Estandarización de un procedimiento para la producción experimental de eumicetoma.
3. Estudiar la respuesta histológica del hospedero en contra de la forma parasitaria producida por *C. carrionii*.

---

## Capítulo 3:

# Hipótesis.

---

### **HIPÓTESIS NULA:**

Si la inmunosupresión es un factor predisponente en el desarrollo del micetoma, entonces los ratones con inmunidad deprimida, desarrollaran más fácil y/o extensamente la formación de granos.

### **HIPÓTESIS ALTERNA:**

La cepa de *C. carrionii*, bajo las condiciones de inmunosupresión manejadas en los ratones, tiene la capacidad de producir cromoblastomicosis, feohifomicosis o puede ser eliminada por el hospedero.

---

## Capítulo 4: Metodología.

---

### Obtención de la cepa.

La cepa fue obtenida a partir del material filante drenado de las lesiones fistulosas del paciente. Este material biológico fue sometido a estudios micológicos de rutina, exámenes directos, cultivos en agar Sabouraud y micosel y microcultivos en los mismos medios.

### Condiciones de cultivo.

Previo a la preparación del inóculo, se ensayaron las condiciones de cultivo en las cuales se obtendrían el mayor número de conidias viables.

Primero se probaron cuatro medios de cultivo: agar Sabouraud (AS), medio mínimo de esporulación (MME), Medio harina de Amaranto (MA) y Medio Borelli (MB) (Ver Apéndice) Una vez seleccionado el medio de cultivo sólido, la incubación se realizó a 28°C por 14 días para todos los medios, con la excepción del ensayo C para el cual la cepa se sembró en cultivo sumergido de caldo Borrelli en una incubadora con agitación constante a 18-20rpm, 30°C, en oscuridad por 6 días, Una vez terminada la incubación se filtró el caldo Borelli y se siguió el mismo procedimiento para la preparación de los inóculos.

## Preparación de inóculos.

Al término de la incubación se agregó 15mL de solución salina isotónica (SSI) estéril a cada uno de los tubos, con un aplicador estéril se removió suavemente la superficie de la colonia para desprender el mayor número de conidias. La suspensión obtenida, fue filtrada por 6 capas de gasa estéril para remover restos de agar y agregados miceliales. El filtrado fue centrifugado a 2,000 rpm por 10 minutos y resuspendido en SSI estéril, este paso se repitió entre 2 a 4 veces, hasta obtener un sobrenadante claro. Una vez obtenida una suspensión rica en conidias, se procedió a realizar las siguientes diluciones:  $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-6}$ , para cuantificar las conidias por mililitro.

Esta cuantificación se realizó en forma manual con ayuda de un hematocitómetro (Ver Apéndice) Una vez cuantificadas las conidias/mL, se prepararon Suspensiones Conidiales (SC) que tuvieran las concentraciones indicadas en cada ensayo.

De estas suspensiones fue sembrada una alícuota en agar Sabouraud y se incubó a 28°C por 72 horas para prueba de pureza (Fig. 11)

## Inoculación en ratones.

A lo largo del este estudio, se realizaron tres diferentes ensayos basados en lo reportado en la literatura. Para los tres ensayos se utilizó un lote de 30 ratones machos de peso promedio de 30g cepa cfw1 fueron divididos en veinte para los experimentos y diez para ser utilizados como controles.

Otro ensayo previo consistió en probar cual es la concentración mínima efectiva, esto fue evaluado basándose en la respuesta inflamatoria macroscópica producida por los inóculos de diferente concentración midiéndose la pata del ratón. Fueron probadas las siguientes concentraciones:

Grupo	Concentración	Grupo	Concentración
C1	$3.5 \times 10^3$ conidias/0.02mL	C3	$1.1 \times 10^6$ conidias/0.04 mL
C2	$2.0 \times 10^4$ conidias/0.04 mL	C4	$0.8 \times 10^7$ conidias/0.04mL

\*Los inóculos fueron preparados en SSI e inoculados en cojinete plantar.

Calificación	mm	Calificación	mm
(-)	1.6-2.0 (control)	(++)	3.0-5-0
(+)	2.0-3.0	(+++)	5.0-6.5

Medición del proceso inflamatorio macroscópico, posterior a la inoculación en la pata del ratón.

**Incubación en Keroll:**  
 \*Sólido, 28°C, 14 días.  
 \*Sumergido, 18-20rpm, 38°C, 6 días.

Realizar de 3 a 4 lavados con SSI centrifugando a 2000rpm por 10 minutos.

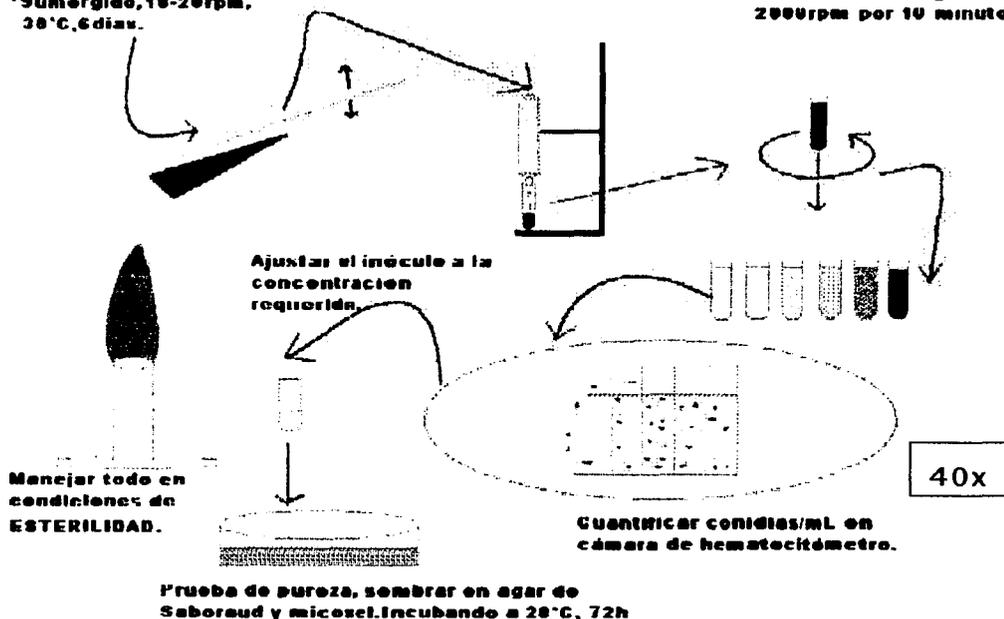


Fig. 11 Resumen del procedimiento para la preparación de los inóculos

Ensayo A: **PRODUCCIÓN EXPERIMENTAL DE EUMICETOMA POR *C. carrionii* EN RATONES INMUNOSUPRIMIDOS CON HIDROCORTISONA.** <sup>(7,8)</sup>

Los ratones del ensayo fueron administrados con hidrocortisona intraperitoneal en una dosis inmunosupresora de 0.5mg/Kg peso. Tomando en cuenta la equivalencia esteroidea entre prednisona e hidrocortisona se administró una dosis total de 0.1mg/día/ratón por 8 días. Al término del tratamiento inmunosupresor se inocularon los ratones, previamente anestesiados con vapores de éter, en el cojinete plantar derecho y utilizando el izquierdo como comparación.

La concentración del inóculo fue del orden de  $10^6$  conidias/0.04mL. Los ratones controles fueron tratados con SSI, y se les administró el mismo inóculo.

Durante un periodo de 60 días los ratones fueron observados buscando presencia de nódulos, fístulas y drenado de granos, fueron sacrificados periódicamente para biopsias y cultivos de hígado, bazo, pata.

Ensayo B: **PRODUCCIÓN EXPERIMENTAL DE EUMICETOMA POR INOCULACIONES REPETIDAS DE *C. carrionii* EN ADYUVANTE COMPLETO DE FREUND.** <sup>(9,5.5)</sup>

Para este ensayo las SC fueron emulsificadas con Adyuvante Completo de Freund (ACF) (Apéndice), en una proporción 1:1

- Inoculación en cojinete plantar:

SC  $1.7 \times 10^6$  conidias -----0.02mL x 20 ratones = 0.4 mL  
ACF-----0.02mL x 20 ratones = 0.4 mL

Emulsión: 0.8mL SC + 0.8mL ACF

□ Inoculación intraperitoneal

SC  $1.4 \times 10^6$  conidias-----0.05mL x 20 ratones = 1.0mL

ACF -----0.05mL x 20 ratones = 1.0mL

Emulsión: 2.0mL SC + 2.0 mL ACF

El ACF es una suspensión aceitosa por lo que la mezcla fue resuspendida enérgicamente varias veces con una jeringa, hasta lograr una sola fase. Se preparó el doble del vol umen total, debido a que la emulsión resultante es muy difícil de manejar.

De la emulsión final se administró 0.04mL/ratón y 0.1mL/ratón para inocular aproximadamente  $1.7 \times 10^6$  conidias/mL y  $1.4 \times 10^6$  conidias/mL, respectivamente.

El esquema de inoculación fue el siguiente:

Semanas	0-10	10-18	18-20
20 ratones	5 inoculaciones en cojinete plantar. (1 cada 2 semanas)	1ª Inoculación intraperitoneal.	2ª Inoculación intraperitoneal.

**MONITOREO PERIÓDICO.**

Los ratones eran examinados y palpados para la búsqueda de nódulos, fístulas y drenado de granos y fueron sacrificados periódicamente para biopsia y cultivo de hígado, bazo, pata.

Los controles fueron 10 ratones inoculados con la misma concentración, pero tratados previamente sólo con SSI

**Ensayo C: PRODUCCIÓN EXPERIMENTAL DE EUMICETOMA POR *C. carrionii* EN RATONES INMUNOSUPRIMIDOS CON CICLOSPORINA A.**

Bajo las condiciones de cultivo particulares para este ensayo fueron preparados los siguientes inóculos:

- $1.0 \times 10^6$  conidias/ 0.04mL (cojinete plantar)
- $1.0 \times 10^6$  conidias/ 0.10mL (espalda, subcutánea)

La inmunosupresión se realizó con ciclosporina A oral (Apéndice) a una dosis de 15mg/Kg peso. Dando como resultado una dosis diaria de 0.5mg/ratón dividida en 2 tomas diarias (8:00 y 18:00)

El esquema de inoculación y monitoreo fue el siguiente:

Días	-2	1(inoculación)	2 al 30
20 ratones Ciclosporina A	0.5mg/ratón	0.5mg/ratón	0.5mg/ratón, diario
20 ratones Inoculación única.		$1.0 \times 10^6$ conidias/0.04mL (cojinete plantar)  $1.0 \times 10^6$ conidias/ 0.10mL (espalda, subcutánea)	

**MONITOREO.**

Los ratones fueron sacrificados de dos en dos los días 1,3,5,8,12,15,18,22,25,30 para toma de muestra de tejidos de piel, pata, bazo, hígado, riñón, cerebro, estas muestras eran divididas para biopsia y cultivo en agar de Sabouraud y micosel. El grupo de ratones control, fue tratado con agua inyectable oral, e inoculados con la misma concentración del inóculo.

## **Procesamiento de las biopsias.**

Las biopsias de los tejidos fueron realizadas con el procedimiento de rutina de inclusión en parafina líquida y tinción de rutina de hematoxilina y eosina (H&E), sólo en algunas biopsias indicadas se realizó tinción de Ácido Periódico de Schiff (PAS)

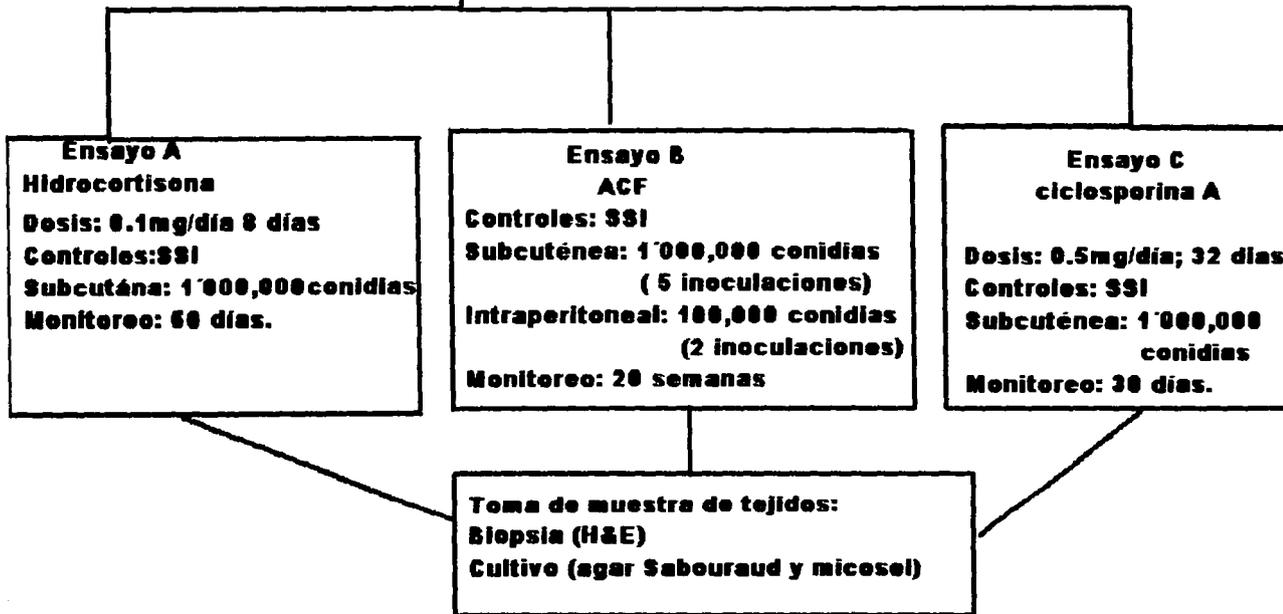
En la figura 12 se resume la metodología de todos los ensayos.

**Estudios micológicos**  
(Cultivos, exámenes directos)

*Cladophialophora carrionii*

Lote de 30 ratones  
machos, de 30g, cepa  
cfw1 para cada ensayo

**Ensayos previos:**  
Condiciones de cultivo.  
Concentración Mínima de Inoculación.



---

## Capítulo 5:

# Resultados.

---

### Cepa

El material seropurulento drenado de las lesiones fue estudiado y al examen directo se observaron varios granos que se describieron como granos negros macroscópicos y fueron observados los elementos miceliales compactados(Fig. 2)

A partir de los cultivos en Sabouraud, en 15 días se obtuvo el desarrollo de una colonia limitada, con apariencia aterciopelada, de color verde oliva muy oscuro con pigmento negro poco difusible al medio y de bordes irregulares (Fig. 6) Se le realizó un examen directo y se observaron hifas macrosifonadas, septadas y dematiáceas. La cepa presentaba estructuras de reproducción a través de microconidias en cadena, en disposición acrópeta, las más grandes estaban en la base y las más chicas en el extremo distal de la cadena, con más de 8 conidias por cadena, entre 8 y 14. La conidias eran de forma elíptica, y las cadenas presentaban pocas ramificaciones. Basándose en sus características macro y microscópicas el hongo fue tipificado como *Cladosporium carrionii*. (Fig.7)

La cepa fue estudiada en otros dos laboratorios por separado, por McGinnis y De Hoog<sup>(\*)</sup>, ambos coincidieron en tipificarla como *Cladophialophora carrionii* el cual es el nombre más correcto de *Cladosporium carrionii*

---

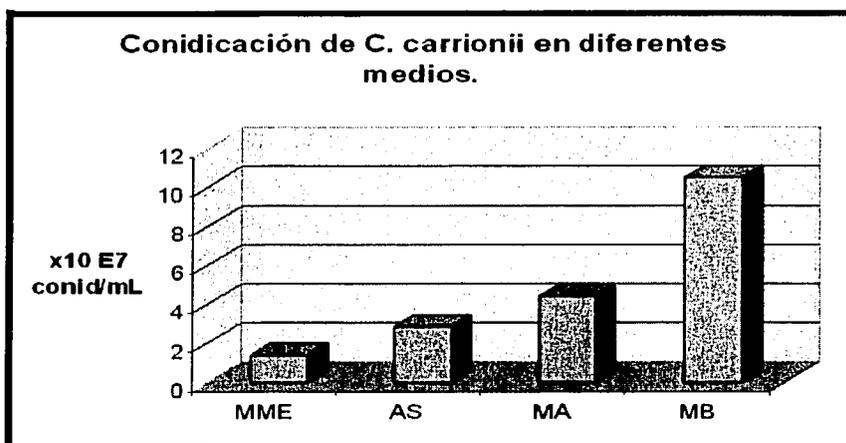
(\*)Comunicaciones personales.

## Ensayos previos.

En la tabla 9 se presentan los resultados de la producción de conidias en cada uno de los medios de cultivo probados:

Medio	Promedio ( $\times 10^7$ conidias/mL)	Intervalo ( $\times 10^7$ conidias/mL)
MME	<b>1.4</b>	<b>(1.0 – 1.7)</b>
AS	<b>2.85</b>	<b>(2.55 - 3.14)</b>
MA	<b>4.42</b>	<b>(4.18 – 4.66)</b>
MB	<b>10.5</b>	<b>(8.20 – 12.80)</b>

Tabla 9. Resultados del estudio de conidiación de *C. carrionii* en 4 medios. MME: Medio Mínimo de Esporulación, AS: Agar Sabouraud, MA: Medio de Amaranto, MB: Medio Borelli (Lactrimel)



El medio que favoreció más la conidiación de la cepa fue el de Borelli, por lo que este fue utilizado para preparar los inóculos de todos los ensayos.

En el ensayo C, cuando la cepa fue cultivada en medio sumergido, con agitación, a 30°C, se utilizó caldo Borelli. La cantidad de conidias producidas bajo estas condiciones fue similar ( $\times=12.5 \times 10^7$  conidias/mL); sin embargo, en el cultivo sumergido comenzó un

desarrollo masivo al tercer día de incubación, mucho más rápido que en medio sólido.

El ensayo de Concentración Mínima Efectiva de Inoculación (CMEI) arrojó los siguientes resultados, para la inoculación subcutánea.

Concentración	Observaciones
$3.5 \times 10^3$ conidias/0.02mL	Proceso inflamatorio inespecífico, que se resolvió espontáneamente en 48-36h
$2.0 \times 10^4$ conidias/0.04 mL	Proceso inflamatorio inespecífico, que se resolvió espontáneamente en 48-36h
$1.1 \times 10^6$ conidias/0.04 mL	Proceso inflamatorio con duración mayor de 8 días
$0.8 \times 10^7$ conidias/0.04mL	Proceso inflamatorio con duración mayor de 8 días

Para que las conidias inoculadas sean capaces de formar estructuras parasitarias en el hospedero, estas deben tener cierta permanencia en el tejido, antes de ser eliminadas por el sistema inmune. Basándose en la duración del proceso inflamatorio, para la inoculación en cojinete plantar se eligió una concentración del orden de  $10^6$  conidias como CMEI.

En el caso de la inoculación intraperitoneal con ACF, los inóculos de  $10^6$  conidias produjeron la muerte de algunos ratones. Para esta vía fueron utilizados inóculos del orden de  $10^5$  conidias.

### **Ensayo A: Inmunosupresión con hidrocortisona.**

Macroscópicamente se observaron lesiones de color hemato-violáceo, con zonas de descamación y puntos negros y aumento de volumen e induración tanto por dorso y planta de la pata inoculada. Esto llegó a su máximo en un termino de 10 días con un aumento de volumen de 5-7mm, después de los 14 días el proceso empezaba a involucionar y para el día 34 ya las lesiones habían curado, dejando zonas de atrofia (Fig. 13)

Las muestras para biopsia y cultivos fueron tomadas después de más de treinta días post-inoculación, ya que se esperó a observar lesiones nodulares, fistulizadas, con granos para tomar muestra, las cuales no aparecieron. Microscópicamente se encontraron procesos inflamatorios inespecíficos y la cepa no se recobró de los cultivos.

### **Ensayo B: Administración con Adjuvante Completo de Freund.**

En el transcurso de las diez semanas de inoculación subcutánea, el comportamiento macroscópico fue igual al del ensayo A (Fig. 13), y no fueron tomadas muestras para exámenes micológicos ni histológicos.

A partir de las inoculaciones intraperitoneales, fueron observados procesos inflamatorios inespecíficos en el hígado y diafragma. El hongo no fue recobrado de ningún tejido.

### **Ensayo c: Inmunosupresión con Ciclosporina A.**

Las lesiones producidas posteriores a la inoculación fueron muy similares a las de los otros dos ensayos (Fig. 13) Sin embargo los cambios microscópicos fueron diferentes y se encuentran resumidos en la tabla 10.

Días post-inoculación	Observaciones
1	Cúmulos de conidias inoculadas
3-5 (4/4 ratones)	<u>Tejido Celular Subcutáneo</u> ( Pata y espalda) Inicio de la formación de un infiltrado granulomatoso supurtativo compuesto por polimorfonucleares, alrededor de las conidias inoculadas
8-15 (6/6 ratones)	<u>Tejido Celular Subcutáneo</u> ( Pata y espalda) Infiltrado granulomatoso purulento de neutrofilos, linfocitos e histocitos, presencia de fibrosis y necrosis, al centro del infiltrado se observaban las conidias. <u>Hígado, Riñón</u> Infiltrado Linfo e histocitario con polimorfonucleares, presencia con conidias
18-22 (1/4)	<u>Tejido Celular Subcutáneo</u> ( Pata y espalda) Granuloma formado por histiocitos epitelioides, presencia de células gigantes multinucleadas, fibrosis y necrosis. Al centro del granuloma encontró el desarrollo de hifas septadas, dematiáceas, naciendo directamente de las conidias. <b>(Fig. 14)</b>
(4/4)	<u>Hígado, Diafragma, Riñón</u> Granuloma con histiocitos epitelioides, neutrofilos y fibroblastos, presencia de conidias. Se observaron células de Kupffer conteniendo pigmento melanínico.
25-30 (2/4)	<u>Tejido Celular Subcutáneo( Pata)</u> Fragmentos de conidias fagocitadas por histiocitos epitelioides.

Tabla 10: Resultados del monitoreo de los tejidos, correspondiente los ratones inmunosuprimidos con ciclosporina A(pata y espalda)

Respecto a la recuperación de la cepa a partir de los tejidos los resultados obtenidos están en la tabla 11.

Días post-inoculación	Órgano	Retrocultivo. (Recuperación de la cepa)
1-8	Pata Hígado, Riñón Bazo, Cerebro	Positivo Negativo Negativo
8-18	Pata Hígado, Riñón Bazo, Cerebro	Positivo Positivo Negativo
18-22	Pata Hígado, Riñón Bazo, Cerebro	Negativo Positivo Negativo
22-30	Pata Hígado, Riñón Bazo, Cerebro	Negativo Negativo Negativo

Tabla 11: Recuperación de la cepa, al sembrar alícuotas de homogenizados de tejido (piel, riñón, hígado, bazo, cerebro) en medio de Sabouraud y micosel, e incubados a 25°C por 2 semanas.

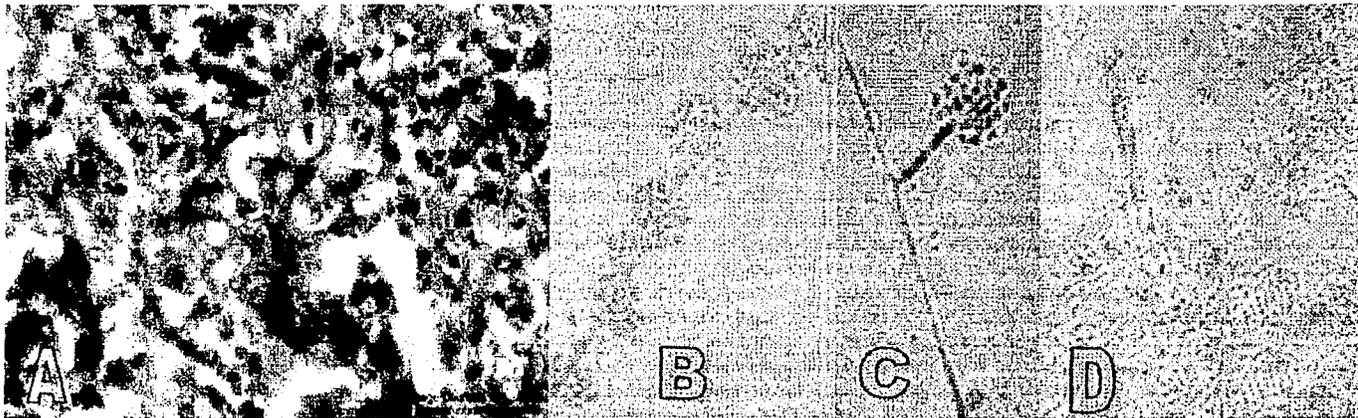


FIG. 10 (A) Feohifomicosis. Se observa en el tejido la presencia de hifas dematiáceas, cortas y septadas, además de algunas conidias, forma parasitaria de los hongos productores de feohifomicosis. Algunos agentes etiológicos de la enfermedad (B) *E. dermatitidis*, (C) *E. janselmei* (D) *P. richardsiae*



Fig. 13 Lesiones experimentales producidas en el cojinete plantar del ratón, debido a la inoculación subcutánea de *C. carrionii* (Ensayos A, B y C)

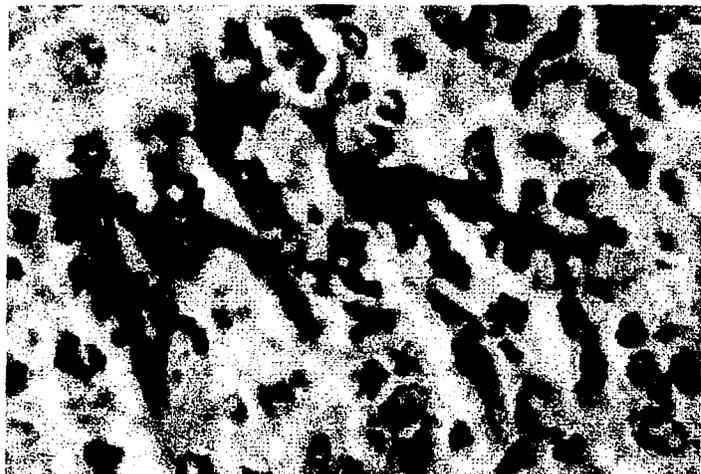


Fig. 14 Histopatología de las lesiones producidas en los ratones del ensayo C. Tejido celular subcutáneo, que presenta un granuloma inflamatorio compuesto por neutrófilos, histiocitos epitelioides, presencia de células gigantes multinucleadas, fibrosis y necrosis (Arriba, 10x, PAS) Al centro del granuloma se observa el desarrollo de hifas septadas, dematiáceas, naciendo directamente de las conidias, imagen característica de una feohifomicosis subcutánea (Derecha, 40x, PAS)

---

## Capítulo 6:

# Discusión de Resultados.

---

### Condiciones de cultivo.

La cepa de *Cladophialophora carrionii*, produce una mayor conidiación cuando es cultivada en medio Borelli, tanto en fase sólida como el cultivo sumergido. El medio Borelli es considerado nutricionalmente pobre, tal vez sea esta tensión ambiental la que provoque la mayor conidiación de la cepa. Como lo muestran los resultados del ensayo C, las conidias obtenidas de los cultivos sumergidos, sujetos a agitación, incubados a 30°C, en obscuridad, mostraron una mayor virulencia que las conidias obtenidas de cultivos sólidos, esto es similar con lo reportado en la literatura<sup>(20)</sup>

Se demostró que la concentración mínima efectiva de inoculación por vía subcutánea fue de orden de  $10^6$  conidias. Concentraciones menores de ésta eran eliminadas por el hospedero entre 48 y 36 h, sin producir respuesta inflamatoria específica, ni formas parasitarias fúngicas. Por la vía intraperitoneal las dosis de inoculación efectivas estaban en el orden de  $10^5$ , concentraciones mayores de  $10^6$  producían muerte instantánea o en 3 horas post-inoculación en algunos ratones.

Respecto al ensayo A, es posible que no haya sido bien manejada la inmunosupresión con hidrocortisona, o esta no fue la adecuada, por lo que no se formaron elementos fúngicos parasitarios. Esto es compatible con el hecho de que en los ratones controles (no inmunosuprimidos) tampoco se produjo ninguna estructura parasitaria

fúngica. Sin embargo, también es probable que el proceso no haya sido monitoreado adecuadamente, ya que las muestras para cultivo y biopsia fueron tomadas después de treinta días post-inoculación, tiempo en el cual pudieron haberse formado las formas parasitarias del hongo y los granulomas, y posteriormente tener una resolución espontánea.

En lo que respecta al ensayo B, se observaron procesos inflamatorios inespecíficos, llegando a producir zonas de necrosis en la cavidad peritoneal, esta inflamación exagerada pudo ser provocada por el efecto inmunoestimulante propio del Adyuvante Completo de Freund. Incluso esta inmunidad exagerada pudo haber propiciado la eliminación del hongo, por lo cual no produjo formas parasitarias e incluso ni siquiera fue recobrado en cultivos.

Por último en el ensayo C, se tuvo un mayor cuidado en el monitoreo del proceso, además el inóculo fue preparado en condiciones que aumentan la virulencia de la cepa. La inmunosupresión empleada fue más específica, ya que la ciclosporina A abate la inmunidad celular mediada por linfocitos T CD4.

Bajo estas condiciones se lograron obtener formas parasitarias del hongo en tejido celular subcutáneo presentándose como hifas septadas, color café claro, estas hifas se encontraban solas y en varios campos se localizaban formándose a partir de las conidias (Fig. 14) Esta forma parasitaria no es compatible con *granos*, dado que las hifas estaban muy dispersas y no formaban el clásico apelonamiento de micelio, por otra parte tampoco correspondía con las células fumagoides de cromoblastomicosis, ya que las células a partir de las cuáles se estaban formando las hifas no presentaban divisiones internas, su pared era muy delgada, no presentaba ese doble contorno, su forma no era esférica sino más bien elíptica, forma más parecida a la conidias inoculadas del hongo; sin embargo, no cabe duda que después de 18 días las conidias inoculadas, tuvieron la capacidad de adaptarse al tejido del hospedero y empezar a desarrollar las estructuras parasitarias mencionadas, las cuales son características de una feohifomicosis subcutánea.

A pesar de que el hongo fue encontrado en otros tejidos como hígado y riñón, este no tuvo la capacidad de parasitarlos y fue eliminado de éstos sitios. Esto comprueba la característica dermatrópica de la cepa de *Cladophialophora carrionii* y es muy importante mencionar que el cerebro fue examinado en todos los ratones y nunca fue encontrado en este tejido, principal característica que diferencia a *C. carrionii* de *C. bantianum*, la cual si es altamente neurotrópica.

La respuesta histológica que se presentó a estas estructuras fúngicas, también es compatible con la respuesta histológica en feohifomicosis reportada en la literatura.

Esta imagen histológica sólo fue encontrada en un solo ratón del grupo de inmunosupresión con ciclosporina A. De los controles ningún ratón presentó estas formas parasitarias del hongo.

Cabe mencionar que nuestro lote de trabajo fue de un número reducido de individuos (20) y que sólo eran sacrificados dos ratones en cada fecha, por lo que no fue posible realizar un análisis estadístico relacionado con la virulencia de la cepa. Sin embargo, la enfermedad fue producida en el 5% (1/20) del lote de ratones inmunosuprimidos, sí se considera que el hongo necesita los dieciocho días para empezar a desarrollarse en tejido, entonces sólo en el 12.5% (1/8) de los animales inoculados se presentaron las estructuras parasitarias del hongo.

---

## Capítulo 7:

### Conclusiones.

---

La cepa de *Cladophialophora carrionii* en estudio fue capaz de producir una feohifomicosis subcutánea en ratones que recibieron terapia de inmunosupresión celular.

No se obtuvo la formación de granos bajo estas condiciones particulares del estudio, por lo que no fue cumplido el postulado de Koch, pero si fue reafirmada su afinidad dermatrópica y capacidad patógena de la cepa, para producir estructuras parasitarias y despertar una respuesta inmune celular en el hospedero.

El hecho de haber producido una feohifomicosis subcutánea, por una cepa de un hongo dematiáceo aislada de un eumicetoma, y que es mundialmente conocida por ser agente etiológico de cromoblastomicosis, tiene respaldo sustentable basándose en las características patológicas de *Phialophora verrucosa*, un hongo muy cercano a *Cladophialophora carrionii*. Los resultados de este estudio demuestran la íntima relación que hay en el comportamiento de estas dos especies de hongos dematiáceos.

Debido al bajo porcentaje en que se presentaron las estructuras parasitarias (5%) fue comprobada la baja virulencia de *Cladophialophora carrionii*.

Se comprobó que las condiciones de cultivo afectan la virulencia de la cepa de *Cladophialophora carrionii*.

---

## Recomendaciones.

---

Para realizar futuros ensayos con esta cepa, se recomienda:

- Utilizar cultivos sumergidos de caldo Borelli, con agitación constante, 30°C de 5 a 6 días de incubación.
- Para inoculación subcutánea utilizar concentraciones del orden de  $10^6$  conidias por sitio.
- Utilizar ratones inmunosuprimidos, sería interesante probar una inmunosupresión mielotóxica, para observar los resultados en ratones neutropénicos.
- Realizar un adecuado monitoreo del proceso, empezando a sacrificar los ratones desde el tercer día para toma de biopsia, y trabajar con un lote más grande de ratones.
- Por último, también resultaría interesante probar el efecto de la cronicidad, es decir, a los ratones neutropénicos dar varias inoculaciones en el transcurso de 2 a 3 meses.

## Bibliografía.

1. Bonifaz A. *Micología Médica Básica* Edit. Méndez Editores 2ªed, 2000, México D.F.
2. Rippon JW *Micología Médica* Edit. Interamericana McGraw-Hill 3ª ed. 1988, México D.F.
3. Known-Chung KJ, Bennett JE. *Medical mycology*. Edit. Lea & Febiger, 1992, Philadelphia, USA.
4. Arenas R. *Micología Médica*. Edit. Interamericana McGraw-Hill, 1992, México D. F.
5. Méndez-Tovar LJ, López-Martínez R, Hernández-Hernández F *Actualidades de Micología Médica*.Edit. UNAM, 2002,México D. F
6. Novales J. *Contribución de la dermatopatología al conocimiento de los micetomas*. Med Cut ILA 1995;23:248-52.
7. Hay RJ, Mahgoub ES, et all . *Mycetoma*. J Med Vet Mycol. 1992; Suppl 1:41-49.
8. Mahgoub ES. *Mycetoma*. Edit William Heinemann Medical Books LTD, 1973,London, pp:83-87
9. McGinnis MR. *Mycetoma*. Dermatologic clinics. 1996;1:97-104
10. Mahgoub ES, El Hassan AM, Fahal AH. in [www.mycetoma.org](http://www.mycetoma.org)
11. Mahgoub ES. *Experimental infection of athymic nude new zealand mice, nu nu strain with mycetoma agents*. Sabouraudia 1978; 16: 211-216

12. Kameswara Rao V, Ram Prasad C. *Experimental Maduromycosis. II. Experimental mycetoma in mice caused by repeated injections of Phialophora jeanselmei*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1975;4:399-401
13. Szaniszlo PJ, Jacobs CW, Geis PA. (1983) *Fungi pathogenic por human & animals*. Edit. Havar Dexter Marcel Dekker, inc. Cincinnati, Ohio, USA. pp:323-327, 380-390
14. Elgart, GW. *Chromoblastomycosis*. Dermatologic Clinics 1996;1:77-83
15. Rinaldi MG. *Phaeohyphomycosis*. Dermatologic Clinics 1996;1:147-153
16. Dixon DM, *The medically important dematiaceous fungi and their identification* Mycoses 1991;34:1-18
17. Turiansky GW, Benson PM, Sperling LC, et al . *Phialophora verrucosa: A new cause of mycetoma* J Am Acad Dermatol 1995;2:311-314
18. De Hoog GS, Mayser P, Haase G, et al . *A new species, Phialophora europaea, causing superficial infections in humans* Mycoses 2000;43: 409-416
19. Zeppenfeldt G, Richard-Yegres N, Yegres F, et al . *Cladosporium carrionii: un hongo dimórfico en cactáceas de la zona endémica para la cromomycosis en Venezuela* Rev Iberoam Micol 1994;11:61-63
20. Yegres F, Richard-Yegres N, Nishimura K, et al . *Virulence and pathogenicity of human and environmental isolates of Cladosporium carrionii in new born ddY mice* Mycopathologia 1991;114:71-76

21. Cardona-Castro N, Agudelo-Flórez P, Restrepó-Molina R. *Chromoblastomycosis murine model and In vitro test to evaluate the sensitivity of Fonsecaea pedrosoi to Ketoconazole, Itraconazole and saperconazole.* Mem Inst Oswaldo Cruz 1996;91:779-784
22. Nishimura K, Miyaji M. *Tissue responses against Cladosporium trichoides and its parasitic forms in congenitally athymic nude mice and their heterozygous littermates.* Mycopathologia 1985;90:21-28
23. Ito E, Yasushi T. *Influences of Immunosuppressive agents FK506 and Cyclosporin on systemic Candida albicans infection in mice.* Mycopathologia 1997;138:57-64
24. Salkowski CA, Balish E. *Cutaneous cryptococcosis in athymic and beige-athymic mice.* Infect Immun 1991;59:1785-1789
25. Cantorna MT, Balish E. *Mucosal and systemic candidiasis in congenitally immunodeficient mice.* Infect Immun 1990;58:1093-1100
26. Maheswari Amma S, Paniker CKJ, Iype PT, et. al y colls. *Phaeoohyphomycosis caused by Cladosporium bantianum in Kerala (India)* Sabouraudia 1979;17: 419-423
27. Silva C. L, Serpuim ME. *Granulomatous reactions induced by lipids extracted from Fonsecaea pedrosoi, Fonsecaea compactum, Cladosporium carrionii and Phialophora verrucosa.* J Gen Microbiol 1985;131(Pt 1)187-194
28. De Hoog GS, Guého E, Masclaux F, et al. *Nutritional physiology and taxonomy of human-pathogenic Cladosporium-Xylohypha species.* J Med Vet Mycol 1995 33:339-347
29. De Hoog GS, Queiroz-Telles F, Haase G, et. al. *Black fungi: clinical and patogénica approaches.* Med. Mycol 2000;38(Suppl1):243-250

30. Masclaux F, Guého E, De Hoog GS, et. al. *Phylogenetic relationships of human-pathogenic Cladosporium (Xylohypha) species inferred from partial LS rRNA sequences.* J Med Vet Mycol 1995;33:327-338
31. Tintelnot K, Von Hunnius P, De Hoog GS. *Systemic mycosis caused by a new Cladophialophora species.* J Med Vet Mycol 1995;33:349-354
32. De Hoog GS, Takeo K, Göttlich E, Nishimura K, et. al. *A human isolate of Exophiala (Wangiella) dermatitidis forming a catenate synamorph that links the genera Exophiala and Cladophialophora.* J Med Vet Mycol 1995;33:355-358
33. Arellano F. *Cuatro casos de cromomicosis por Cladosporium carrionii y su tratamiento.* Derm Iber Lat Am 1981;10:5-17
34. Fafutis-Morris M, Guillén-Vargas C. *Respuesta inmunitaria en las micosis.* Dermatología Rev Mex 1999;43(Suplemento):S54-S61
35. Clemons KV, Calich VLG, Burger E, et. al. *Patogenesis I: interactions of host cells and fungi.* Med Mycol 2000;38(Suppl I):99-111
36. Goodman & Gilman (1996) *Las bases farmacológicas de la terapéutica.* vol. II.9ª ed. Edit. McGraw-Hill. México D. F. pp:
37. SANDIMMUN/NEORAL. Inserto, Indicaciones amplias para prescribir. Novartis Farmacéutica(2001)

---

## Apéndice.

---

### I. Medios de cultivo.

#### Medio Mínimo de Esporulación (MME)

Acetato de Potasio.....	10.0g
Extracto de levadura.....	..2.5g
Dextrosa.....	1.0g
Agar.....	30.0g
Agua c.b.p.....	1,000mL

#### Medio Harina de Amaranto (MA)

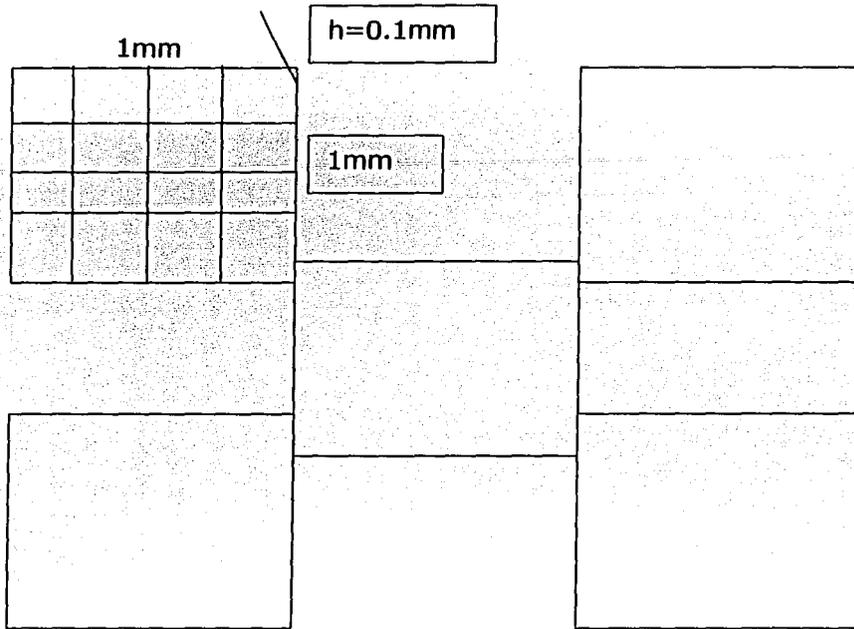
Harina de amaranto.....	25.0g
Dextrosa.....	10.0g
Agar.....	15.0g
Agua c.b.p.....	1,000mL

#### Medio Borelli (MB) o lactrimel.

Harina de trigo.....	14.0g
Leche en polvo.....	14.0g
Miel de abeja.....	7.0g
Agar.....	20.0g
Agua c.b.p.....	1,000mL

Estos medio se esterilizan a 110°C por 15 minutos.

## II. Conteo celular en la cámara del hematocitómetro.



Las células contadas en estos 16 cuadros, se encuentran contenidas en un volumen de  $0.1 \text{ mm}^3$   
 $1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ mL}$  y  $1 \text{ cm}^3 = 1,000 \text{ mm}^3$   
 Por lo tanto:  $1,000 \text{ mm}^3 = 1 \text{ mL}$

X células -----  $0.1 \text{ mm}^3$   
 Y células -----  $1,000 \text{ mm}^3$

El factor es  $1,000/0.1 = 10,000 = 10^4$

Por lo que el número de células contadas en 16 cuadros se multiplican por  $10^4$  y se obtienen células/mL. Por último habría que multiplicar por el factor de dilución correspondiente, si éste existe.

### III. Adyuvante Completo de Freund (ACF)

En el área de la Inmunología, una Adyuvante es una sustancia usada en combinación con un antígeno específico, que producen más inmunidad que el antígeno solo.

El ACF es una emulsión de agua en aceite, mayor cantidad de aceite que de agua, contiene fragmentos de *Mycobacterium sp* muertos por calor. La fórmula clásica, contiene 85% de aceites y 15% de emulsificador.

### IV. Ciclosporina A (CyA) oral (**SANDIMMUN NEORAL**)

La absorción de la ciclosporina por vía gastrointestinal es variable. Por esto es muy importante seguir las indicaciones del laboratorio para su administración. SANDIMMUN / NEORAL, es ciclosporina A en una presentación oral, para lograr una adecuada absorción del medicamento se recomienda dividir la dosis diarias en dos tomas (cada doce horas) La dosis diaria del medicamento puede ser diluida en agua.

El producto tiene una concentración de 100mg/mL. La dosis más Alta recomendada es de 15mg/Kg peso. La dosis calculada para los Ratonés fue 0.5mg/día:

$$\begin{array}{r} 15\text{mg} \text{-----} 1,000\text{g} \\ x\text{mg} \text{-----} 30\text{g} \end{array} \quad \mathbf{x = 0.45\text{mg/día ratón}}$$

$$\text{SANDIMMUN/NEORAL:} \quad 100\text{mg} \text{-----} 1\text{mL}$$

$$x\text{mg} \text{-----} 0.1\text{mL} (100\mu\text{L})$$

$$x = 10\text{mg CyA}$$

$$\mathbf{10\text{ mg}/10\text{ mL} = 1\text{mg/mL}(\text{Solución A})}$$

Por lo tanto cada 1.0 mL de la solución A contienen 1.0 mg CyA, de ésta solución se deben administrar 0.5mL por vía oral repartido en dos dosis (0.25mL 8:00 h y 0.25mL 18:00h) La solución A se debe preparar para cada una de las administraciones.