
Histopatología y ultraestructura de la cromomicosis causada por *Cladosporium carrionii*.

Auristela Sánchez-Mirt¹, Maigualida Pérez-Blanco¹, Eduardo Caleiras² y Olga Rangel¹.

¹Unidad de Microscopía Electrónica, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Coro, Venezuela e ² Instituto Anatomopatológico, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Palabras claves: Cromomicosis, *Cladosporium carrionii*, histopatología, ultraestructura, microscopía electrónica.

Resumen. Se realizó estudio histopatológico, mediante el uso de microscopio fotónico y electrónico, de la cromomicosis causada por *C. carrionii*. Se tomaron biopsias a 10 pacientes y se procesaron por las técnicas histológicas convencionales de hematoxilina y eosina y de microscopía electrónica de transmisión. Al microscopio de luz se evidenciaron los componentes granulomatoso y supurativo del proceso infeccioso acompañado de otros elementos celulares como linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y células de Langerhans. El hongo se observó libre o en el interior de células fagocíticas. Ultraestructuralmente presentó una pared celular gruesa, laminar y electrondensa. La membrana citoplasmática mostró abundantes invaginaciones y vacuolas que contenían un material electrondenso. Se plantea la existencia de un proceso de secreción-excreción del pigmento oscuro parecido a melanina, el cual se deposita en la pared celular del hongo contribuyendo así a la resistencia que opone la célula fúngica a su destrucción por el fagocito. Se hace necesario determinar el papel exacto de las células de Langerhans en la cromomicosis causada por *C. carrionii*.

Histopathology and ultrastructure of chromomycosis caused by *Cladosporium carrionii*.

Invest Clin 36(4): 173-182, 1995.

Key words: Chromomycosis, *Cladosporium carrionii*, histopathology, ultrastructure, electron microscopy.

Abstract. Light and electron microscopic study of cromomycosis caused by *C. carrionii* was undertaken. Biopses from 10 patients were taken and processed by means of conventional histopathologic techniques of hemato-

xiline and eosine and by transmission electron microscopy. Granulomatous and suppurative components of the infection process were observed by the histological procedure, other cellular elements such as lymphocytes, plasma cells, eosinophils and Langerhans cells were present. The fungus was observed free or within phagocytic cells. Ultrastructural evidence revealed that it was surrounded by a wide multilayered and electron dense cell wall. Its cytoplasmic membrane presented invaginations and vacuoles containing the electrondense material. We suggest the existence of a secretion-excretion process of a melanin-like dark pigment, which is accumulated on the cell wall of fungus, increasing the resistance of fungic cell to its destruction by phagocytic cell. It is necessary to determine the exact role of Langerhans cells in chromomycosis caused by *C. carrionii*.

Recibido: 21-2-95. Aceptado: 23-5-95.

INTRODUCCION

La cromomicosis es una enfermedad crónica, granulomatosa y supurativa, generalmente localizada en la piel y causada por los cromomicetos, especies de hongos pertenecientes a la familia *Dematiaceae* (4, 5). Estos hongos son de color negro por la acumulación, en la pared celular, de un pigmento polimérico que ha sido caracterizado como melanina (1). Las principales especies de hongos dematiaceos causantes de cromomicosis son: *Cladosporium carrionii*, *Fonsecaea pedrosoi* y *Phialophora verrucosa*.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son similares, independientemente de la especie causante. Las lesiones se desarrollan sobre áreas del cuerpo expuestas a un trauma y se caracterizan por ser lesiones nodulares, verrugosas, de superficie irregular y variablemente escamocostrosas que pueden generar la incapacidad del paciente. En el curso clínico de la infección jue-

gan papel importante los factores individuales (22), siendo determinante la inmunidad mediada por células (12). En un intento por caracterizar la respuesta inmune local se han realizado estudios preliminares que describen la topografía de las células secretoras de citokinas dentro de la lesión (10).

Los estudios histopatológicos demuestran que durante el curso de la enfermedad se produce un granuloma micótico organizado, modificado por la presencia de neutrófilos; igualmente se observa una hiperplasia pseudoepiteliomatosa en la cual el epitelio parece jugar un papel importante en la eliminación transepitelial del hongo (20). Hasta ahora se desconoce la morfogénesis de este granuloma. Es bien conocido que el curso clínico de las enfermedades infecciosas está dado por la relación huésped-parásito, por lo tanto será basado en esta interacción como se puedan realizar estudios tendientes a establecer los procesos inmunorregulatorios del gra-

nuloma micótico causado por *C. carrionii*. En el presente trabajo se evaluaron, por microscopía fotónica y electrónica de transmisión, los cambios morfológicos ocurridos en la célula fúngica y en el tejido del huésped durante la cromomicosis causada por *C. carrionii*.

MATERIAL Y METODOS

Se tomaron biopsias a diez pacientes que presentaban lesiones sugestivas de cromomicosis activa quienes eran procedentes de la zona semiárida del estado Falcón, Venezuela. El diagnóstico micológico de la enfermedad y la identificación del agente causal se realizó según la metodología reportada previamente (16).

Cada biopsia fue dividida en dos porciones para su procesamiento por las técnicas histológicas convencionales y para microscopía electrónica de transmisión. Una porción fue fijada con una solución de formalina al 10%, incluida en parafina, seccionada en cortes de 5 m de grosor y coloreada con hematoxilina y eosina. El resto de la muestra se procesó como se indicó previamente (19), para lo cual se fijó con una solución de glutaraldehído al 2% en tampón cacodilato de sodio 0,2 M; pH 6,8, se lavaron tres veces en el mismo tampón; se post-fijaron con tetraóxido de osmio al 2% y después de tres lavados con agua bidestilada-deionizada se deshidrataron en una serie ascendente de alcoholes, las muestras se incluyeron en Araldita 502 (Electron Microscopy Sciences, U.S.A.), se hicieron cortes

ultrafinos en un Ultramicrotomo Sorvall Porter-Blum MT2-B (DUPONT, división de productos biomédicos, U.S.A.) y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico NIKON y en un microscopio electrónico de transmisión (Marca Hitachi Modelo H-7000, Japón).

RESULTADOS

Diagnóstico micológico

En todos los pacientes se aisló e identificó *C. carrionii* como el agente causal de la cromomicosis.

Histopatología

Se observaron fragmentos de piel con hiperparaqueratosis, marcada acantosis y papilomatosis. En la epidermis abundaban microabscesos (Fig. 1 A) ocupados por neutrófilos y en la dermis superior, media e interpapilar era frecuente observar denso infiltrado inflamatorio de predominio mononuclear linfocítico-histioplasmocitario (Fig. 2), acompañado o no por polimorfonucleares neutrófilos que tendían a la formación de granulomas. La presencia de células micóticas en los granulomas era variable; cuando estaban presentes se les identificaban en el interior de células gigantes multinucleadas, como células redondeadas de color marrón claro, algunas divididas por tabiques ecuatoriales y limitadas por una gruesa pared celular birrefringente (Fig. 1 B), también se podían observar aisladas o dispuestas en grupos de dos (Fig. 1

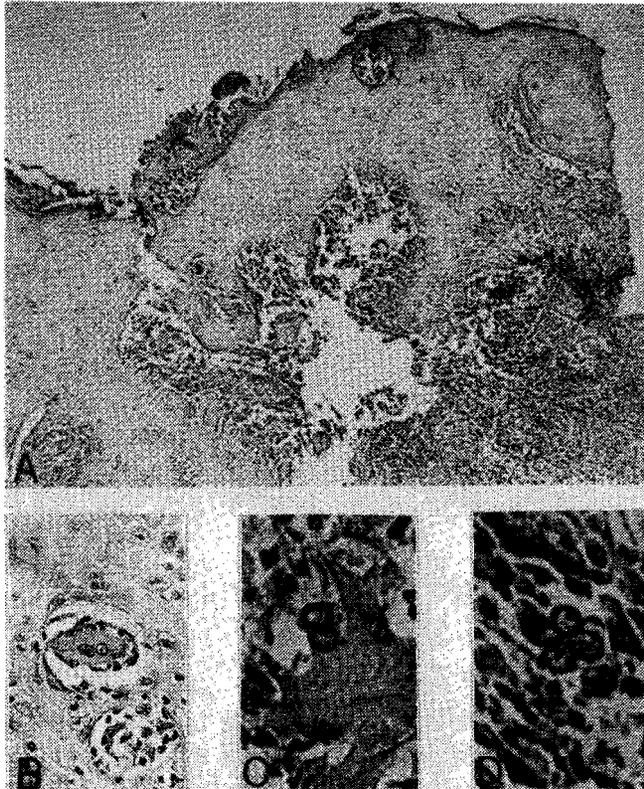


Fig. 1. Microabscesos en la epidermis y en la dermis de paciente con cromomicosis (A). Las células escleróticas se pueden observar en el interior de células gigantes (B) o libres y dispuestas en grupos de dos (C) a cuatro células (D).

C) ó cuatro cuerpos escleróticos (Fig. 1 D).

Ultraestructura

El estudio ultraestructural mostró un infiltrado celular mixto compuesto por neutrófilos, histiocitos, linfocitos y en menor proporción eo-

sinófilos y células plasmáticas organizadas alrededor del hongo. Este se observó aislado o formando grupos de dos o más cuerpos escleróticos libres o en el interior de células fagocíticas (Fig. 3). La morfología de las células fúngicas era variable y se podían observar, alternando, célu-

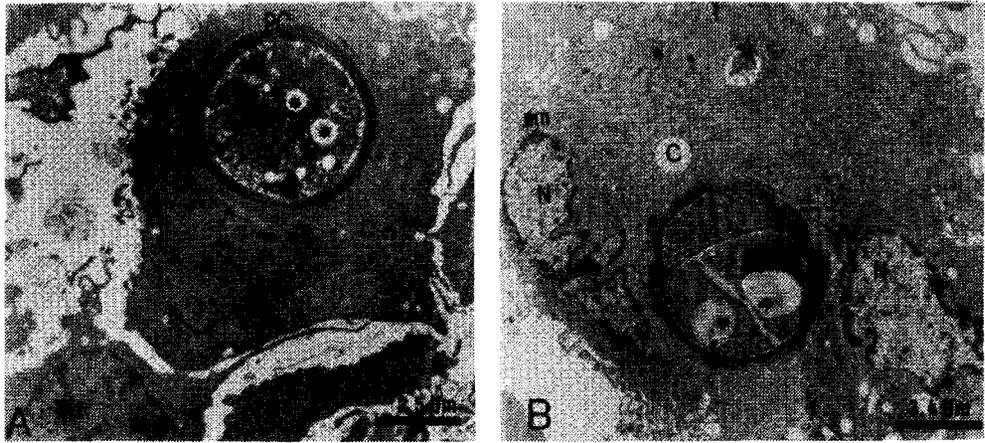


Fig. 2. Cuerpos escleróticos de *C. carrionii* sin segmentación transversal, fagocitado por histiocito (A) y con tabiques transversales fagocitado por neutrófilo (B). Los asteriscos señalan estructuras vesiculares de diferentes tamaños.

Abreviaturas: PC: pared celular; N: núcleo; C: citoplasma; V: vacuolas; cea: cuerpos electrondensos alargados; mn: membrana nuclear.

las sin división interna (Fig. 3 A) con otras que presentaban de uno a tres tabiques que la dividían en dos a cuatro células (Fig. 3 B). La pared celular presentó dos capas: una externa electrondensa, irregular, de 500 a 800 nm de espesor y de apariencia laminar. Estas láminas se observaban más condensadas en su cara interna (Fig. 4) y al introducirse al interior del hongo formaban los septos transversales que lo dividían en dos o más células. Inmediatamente por dentro de la pared celular externa se observaba una estrecha zona electrotransparente de 40 a 140 nm de espesor que era representativa de la pared celular interna. Por fuera de la pared celular se observaban cuerpos electrondensos alargados en números de 2 o más (Fig. 3 A).

La membrana citoplasmática de aspecto irregular presentó invaginaciones en cuyo interior se observa-

ban acúmulos de cuerpos membranosos y pequeñas vesículas con un contenido granular electrondenso (Fig. 4 B, C). El citoplasma igualmente presentaba un aspecto variable; en algunas células fúngicas era homogéneo, con abundantes ribosomas libres, retículo endoplasmático rugoso, núcleo y pequeñas vesículas; en otro el citoplasma se encontraba ocupado en su casi totalidad por una gran vacuola central con cuerpos osmiofílicos en su interior. En la epidermis y cercano a las zonas de mayor infiltración se observaron células de Langerhans con un núcleo dentado y con los gránulos de Birbeck en forma de raqueta (Fig. 5).

DISCUSION

Las evidencias han señalado al estado Falcón, situado en la región noroccidental de Venezuela, como



Fig. 3. Detalles de la pared celular de *C. carrionii*. Note en (A) su disposición laminar con una zona interna de aumentada densidad electrónica. En (B) y (C) las flechas señalan invaginaciones de la membrana citoplasmática con un contenido vacuolar.

Abreviaturas: PC: pared celular; r: ribosomas libres; rer: retículo endoplasmático rugoso; CO: cuerpo osmófilico.

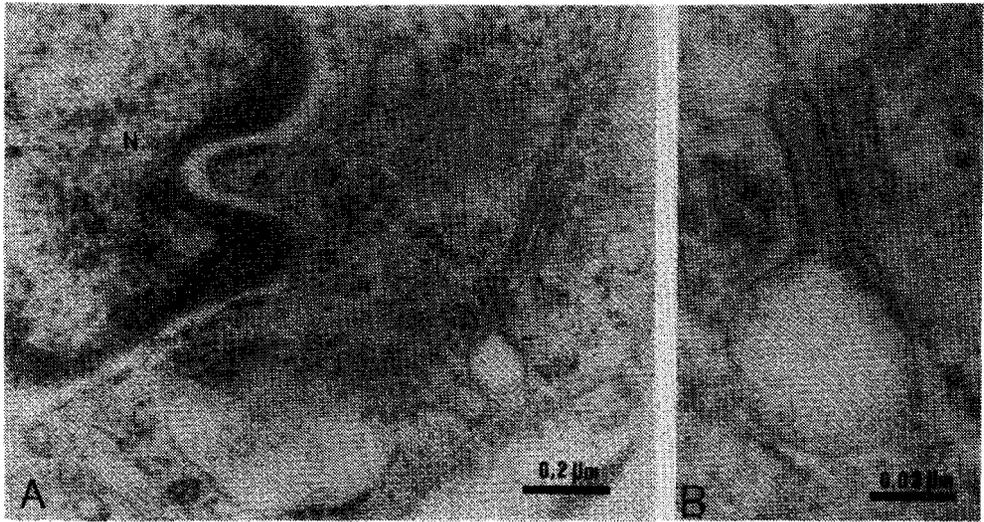


Fig. 4. (A) Célula de Langerhans magnificada. Note parte del núcleo (N) dentado y los gránulos de Birbeck intra-citoplasmáticos (flechas). (B) detalle de un gránulo de Birbeck en forma de raqueta.

área endémica y reservárea para la cromomicosis por *C. carrionii* (17, 22, 23). La evolución clínica de la cromomicosis al igual que otras enfermedades micóticas (8, 14), tiende a la cronicidad y produce una respuesta granulomatosa, altamente organizada, modificada por la presencia de neutrófilos, en la cual el epitelio parece jugar un papel importante en la eliminación transepidérmica del hongo (20). En nuestro estudio, igualmente evidenciamos por histopatología, los componentes granulomatoso y supurativo que caracterizan al proceso infeccioso, acompañado de otros elementos celulares como linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y células de Langerhans. Estos hallazgos sugieren que las células inmunocompetentes de la epidermis y en particular éstas últimas juegan un papel

importante en la respuesta local inmune desarrollada contra *C. carrionii*, de manera similar a lo que ocurre en otras enfermedades infecciosas como la Leishmaniasis (3, 7, 15). Se plantea la necesidad de emprender futuros estudios tendientes a esclarecer la participación de las células de Langerhans en la cromomicosis.

Aunque se desconoce la patogénesis de esta enfermedad, un hecho de singular importancia es que hasta ahora no se han reportado casos de cura espontánea en la cromomicosis causada por *C. carrionii* (18). Se piensa que el principal factor patológico está relacionado con la persistencia *in situ* del hongo (10). Por otra parte existen evidencias que los pacientes con esta enfermedad fúngica presentan una supresión parcial de la inmunidad celular, con un

marcado defecto de las células T, desconociéndose la naturaleza exacta de tal disfunción (12). Se cree que esta supresión contribuye a la persistencia del hongo en el tejido y a la cronicidad de la enfermedad, de tal manera que la supresión de la inmunidad mediada por células puede ser causa o efecto de la cromomycosis (12). En nuestro estudio pudimos observar, a nivel ultraestructural, la persistencia y viabilidad del hongo aún cuando se encontraba fagocitado por macrófagos o por polimorfonucleares. Esto se evidenció por la integridad de la célula fúngica, la marcada actividad metabólica demostrada por la abundancia de ribosomas, retículo endoplasmático rugoso y lo que es más importante por la división de las células en dos o más cuerpos escleróticos en el interior de las células fagocíticas. Estos hallazgos nos inducen a pensar que el hongo presenta resistencia a la muerte, después de ser fagocitado por dichas células. Este fenómeno también ha sido observado en infecciones por *Blastomyces dermatitidis*, habiéndose explicado por una deficiencia en el depósito de mieloperoxidasa asociado con el hecho de que el tamaño del hongo le impide su completa internalización (6). Igualmente se ha descrito que los polimorfonucleares de pacientes con paracoccidioidomycosis presentan una deficiencia específica para la digestión del *Paracoccidioides brasiliensis* (13). La resistencia que presenta *C. carrionii* a ser destruido por el fagocito pudiera estar relacionada con la morfología y composición de

la pared celular de los cuerpos escleróticos. Estudios ultraestructurales de estas células obtenidas *in vivo* e *in vitro* (2) sugieren que presentan características morfológicas parecidas, con una pared celular laminar y más gruesa que la de las células vegetativas, con depósitos de un pigmento oscuro que ha sido caracterizado como melanina el cual también se puede observar en el interior de estructuras citoplásmicas (1). Se ha sugerido que la presencia de este pigmento parecido a melanina tiene un efecto inhibitorio sobre la fagocitosis y posiblemente juega un papel importante en la interacción huésped-parásito (11). Nuestros resultados coinciden con los presentados por estos autores, llamando la atención el tipo de vacuola citoplásmica que contenía a la célula fúngica en la cual no existía ningún espacio entre la pared del hongo y la membrana de la vacuola, correspondiendo a la fagocitosis clásica tal como ha sido reportada previamente (11). De igual forma nosotros observamos alrededor de la pared celular externa la presencia de cuerpos electrondensos alargados que parecen representar segmentos de pared pigmentada los cuales podrían estar cumpliendo un papel importante en la resistencia que presenta el hongo a su destrucción por la célula fagocítica.

Un hallazgo importante fue la gran cantidad de invaginaciones de la membrana citoplasmática con un contenido vacuolar electrondenso en su interior semejando un proceso de excreción. Estos hallazgos indu-

cen a pensar que en la forma parasitaria de *C. carrionii* el pigmento oscuro parecido a melanina es sintetizado por el hongo en el interior de estructuras citoplasmáticas y por un mecanismo de excreción, en el cual la membrana citoplasmática juega un papel fundamental, es transportado hasta la pared celular donde se deposita de adentro hacia afuera dándole un aspecto laminar a la pared celular del hongo.

Estos resultados evidencian los cambios morfológicos que ocurren en la relación huésped-parásito durante el curso clínico de la cromomicosis causada por *C. carrionii*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración prestada por el personal técnico de la UME-UNEFM. Trabajo parcialmente financiado por FUNDACITE - FALCON, N° FC-0033.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- ALVIANO C., FARBIARZ S.R., de SOUZA W., ANGLUSTER J., TRAVASSOS L.R.: Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* melanin. J General Microbiol 137:837-844, 1991.
- 2- ALVIANO C.S., FARBIARZ S.R., TRAVASSOS L.R., ANGLUSTER J., de SOUZA W.: Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. Mycopathologia 119:17-23, 1992.
- 3- BLANK CH., FUCHS H., RAPPERSBERGER K., ROLLINGHOFF M., MOLL H.: Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. J Infect Dis 167: 418-25, 1993.
- 4- BORELLI D.: Cromomicosis: diagnóstico y tratamiento. p 60-80. XIII Jornadas Nacionales de Microbiología, Coro, Venezuela 1983.
- 5- BORELLI D.: Cepas displásticas de *Clasdosporium carrionii* Dermatol Venez 26:39-45, 1988.
- 6- BRUMMER E., KURITA N., YOSHIDA S., NISHIMURA K., MIYAJI M.: A basis for resistance of *Blastomyces dermatitidis* killing by human neutrophils inefficient generation of myeloperoxidase system products. J Med Vet Mycol 30:233-43, 1992.
- 7- CACERES-DITTMAR G., SANCHEZ M.A., ORIOL O., KRAAL G., TAPIA F.J.: Epidermal compromise in american cutaneous leishmaniasis. J Invest Dermatol 99:95S-98S, 1992.
- 8- DEFAVERI J., MARTIN L.C., FRANCO M.: Histological and ultrastructural study of the inflammation evoked by *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in previously immunized mice. Mycopathologia 105:53-58, 1989.
- 9- ESTERRE P., PEYROL S., SAINTE-MARIE D., PADRINAUD R., GRIMAUD J.A.: Granulomatous reaction and tissue remodeling in the cutaneous lesion of chromomycosis. Virchows Arch A 422:285-91, 1993.
- 10- ESTERRE P., LORTAT-JACOB H., SAINTE-MARIE D., PRADINAUD R., GRIMAUD J.A.: The potential

- role of cytokines in the immunopathology of chromomycosis. *J Mycol Méd* 4:145-148, 1994.
- 11- FARBIARZ S.R., de CARVALHO T.U., ALVIANO C., de SOUZA W.: Inhibitory effect of melanin on the interaction of *Fonsecaea pedrosoi* with mammalian cells *in vitro*. *J Med Vet Micol* 30:265-273, 1992.
 - 12- FUCHS J., PECHER S.: Partial suppression of cell mediated immunity in chromoblastomycosis. *Mycopathologia* 119:73-76, 1992.
 - 13- GOIHMAN-YAHR, M., ESSENFELD-YAHR, E., ALBORNOZ, M., YARZABAL, L., GOMEZ, M., SAN MARTIN, B., OCANTO, A., GIL, F., CONVIT J.: Defect of In Vitro Digestive Ability of Polymorphonuclear Leukocytes in Paracoccidioidomycosis. *Infection and Immunity* 28:557-566, 1980.
 - 14- HIRUMA M., KAWADA A., NODA T., YAMAZAKI M., ISHIBASHI A.: Tissue response in sporotrichosis: light and electron microscopy studies. *Mycoses* 35:35-41, 1992.
 - 15- MOLL H., FUCHS H., BLANK CH., ROLLINGHOFF M.: Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific t cells. *Eur J Immunol* 23:1595-1601, 1993.
 - 16- PEREZ-BLANCO M., YEGRES F., RICHARD-YEGRES N., HUMBRIA L., HERNANDEZ R., ZEPPENFELDT G.: Itraconazol: eficacia en cromomycosis por *Cladosporium carrionii*. *Dermat Venez* 32:13-16, 1994.
 - 17- RICHARD-YEGRES N., YEGRES F.: *Cladosporium carrionii* en vegetación xerófila. Aislamiento en una zona endémica para la cromomycosis en Venezuela. *Dermat Venez* 25:15-18, 1987.
 - 18- RICHARD-YEGRES N., YEGRES, F., ZEPPENFELDT G.: Cromomycosis: epidemia rural, laboral y familiar en Venezuela. *Rev Iberoam Micol* 9:38-41, 1992.
 - 19- SANCHEZ-MIRT A., GIL F., APITZ-CASTRO R.: Actividad *in vitro* e *in vivo* del ajoene sobre *Coccidioides immitis*. *Rev Iberoam Micol* 11:99-104, 1994.
 - 20- URIBE-J.F., ZULUAGA A. I., LEON W., RESTREPO A.: Histopathology of chromoblastomycosis. *Mycopathologia* 105:1-6, 1989.
 - 21- YEGRES F, RICHARD-YEGRES N, MEDINA RUIZ E, GONZALEZ-VIVAS R.: Cromomycosis por *Cladosporium carrionii* en criadores de caprinos del Estado Falcón. *Invest Clin* 26:223-246, 1985.
 - 22- YEGUEZ-RODRIGUEZ J., RICHARD-YEGRES N., YEGRES F., RODRIGUEZ-LARRALDE A.: Cromomycosis: susceptibilidad genética en grupos familiares de la zona endémica en Venezuela. *Acta Cient Venez* 43:98-102, 1992.
 - 23- ZEPPENFELDT G., RICHARD-YEGRES N., YEGRES F., HERNANDEZ R.: *Cladosporium carrionii* hongo dimórfico en cactáceas de la zona endémica para la cromomycosis en Venezuela. *Rev Iberoam Micol* 11:61-63, 1994.