

Sobre um hiphomiceto isolado de lesões esporotrichoides da face (*)

Spondylocladium atro-olivaceum n. sp.

por

AROEIRA NEVES

(*Instituto Ezequiel Dias, Belo Horizonte*).

(Com as estampas LXXXV—LXXXVI).

INTRODUÇÃO

Em 29 de outubro do ano proximo passado, o Prof. Ildeu Duarte enviou-nos, afim de pesquisarmos, cogumelos nas lesões de que era portador, o Sr. C. Q., com trinta e seis anos de idade, *chauffeur*, que sofrera um desastre de automovel e, em consecuencia, traumatismo e ferimentos na face, que fôra de encontro ao sólo e gramineas que o recobriam. Constituíam-se estas lesões, situadas do lado esquerdo, atingindo a região nasogeniana e segmento da palpebra inferior, de pequenos abcessos furunculoides, alguns dos quaes ulcerados. Na parte média da região nasogeniana, localisava-se uma ulceração maior, com orificio, de onde surdia pús branquicento, de mistura com pequenos coagulos sanguineos.

Reação inflamatória intensa e endurecimento facilmente perceptíveis. A disposição e o aspecto das lesões faziam lembrar as da esporotricose.

Com o pús delas retirado, foram feitas sementeiras em meios de culturas de Sabouraud maltosado e com mel de abelhas, sendo os tubos conservados á temperatura ambiente.

Nas primeiras quarenta e oito horas, observámos o aparecimento de colonias de *Staphylococcus albus* e de um bacilo Gram negativo, que não identificámos.

Entre o quarto e o quinto dia, desenvolveu-se no meio de Sabouraud maltosado uma pequena colonia, que, macroscopicamente, apresen-

[*] Recebido para publicação a 15 de Agosto de 1931.

tava o aspecto estrelado comparavel ao de uma colonia de *Sporotrichum beurmanni*.

Ao oitavo dia, a colonia, atingindo diametro aproveitavel para novas sementeiras, forneceu-nos material suficiente para tal fim em outros meios culturaes.

O exame microscopico de esfregaços, feitos com o pês das lesões, nada digno de nota nos revelou. A reacção de Wassermann, praticada com o sôro sanguineo do paciente, foi positiva e este resultado levou o Prof. Ildeu Duarte a praticar o tratamento iodo-mercurial, com o qual melhoraram bastante o aspecto e o estado das lesões. Atualmente, o doente apresenta, na pêle da região lesada, uma cicatrís um tanto profunda, com bordos irregulares, muito semelhante á esporotricosica (est. LXXXV).

Aspecto macroscopico das culturas:—a) Em meio de Sabouraud maltosado—Aos 15 dias, cultura de contôrno circular, elevada na porção central, apresentando sulcos que dahi se dirigem para a peripheria. Apresenta pequenos tufos de pêlos, comparaveis aos de rato, na porção central e na que se lhe segue, de um matiz que fica entre o camurça olivar intenso (Ridgway-*Color Standards and nomencl.* 1912, Pl. XL, 21 '''' O-YY, b) e o camurça olivar escuro (Ridgw. Pl. XL. 21 '''' O.YY), sobresahindo no fundo preto. A esta segunda zona sucede uma terceira, preta, glabra, que é circumdada por uma quarta, estreita, com os matizes entre o camurça olivar intenso e o olivar escuro. Periferia um tanto assetinada, mostrando pêlos muito delicados, não formando radiações perceptíveis. Nesta ocasião mede $1,5 \times 1,5$ cms.

Aos 60 dias, toda a cultura se torna preta e atinge nos tubos de cultura um diametro longitudinal de 6,5 cms. por 2,5 cms. de largura.

b) Em meio de Sabouraud com mel de abelhas.—Aos 18 dias, culturas discoides, elevadas na porção central, onde apresentam umbilicação. Dos lados desta parte sulcos profundos, ordinariamente quatro, que se dirigem radiariamente para a periferia e dividem a cultura em setores distintos, apresentando estes, por sua vês, pequenos sulcos secundarios menos profundos e menos nitidos em sua porção periferica. Na umbilicação central nota-se espessa formação penujosa, dando-lhe o aspecto de feltro grosso; nos setores acima referidos esta penugem é mais curta. Estreita orla periferica, de aspecto assetinado, limita nitidamente a cultura da porção de substrato que se lhe segue. A coloração das culturas, neste meio, varia entre o camurça olivar escuro (Ridgw. Pl. XL. 21 '''' O-YY) e o olivar escuro (Ridgw. Pl. XL. 21 '''' O-YY,m); difunde-se pelo substrato cultural um pigmento terra de sombra de Saccardo (Ridgw. Pl. XXIX. 17'''. O-Y, k). Diametros $1,5$ cms. \times $1,5$ cms., aproximadamente.

Aos 60 dias, as colônias perdem o revestimento penujoso, tornam-se um tanto corrugadas e glabras e apresentam aspecto comparável aos da cultura de *Piedraia hortai*, não sendo, entretanto, tão consistentes. No reverso apresentam coloração pardo-cravo (Ridgw. Pl. XL. 17'''. O.Y, m-clove brown), atingindo, em largura, as paredes do tubo de cultura.

c) Em meio de Sabouraud glicosado.—As colônias iniciais assemelham-se bastante às do *Sporotrichum beurmanni* como já dissemos. Delas se diferenciam, entretanto, por isso que, ao quinto dia, já se mostram coloridas de camurça olivar intenso (Ridgw. Pl. XL. 21'''. O-YY, b) e um tanto penujosas. À medida que envelhecem, a coloração varia deste matiz ao olivar intenso (Ridgw. Pl. XL. 21'''. O-YY, k), e nas colônias onde não ha desenvolvimento de penugem a coloração é preta. Difunde-se, até certa extensão, em torno das culturas, pelo substrato cultural, um pigmento pardo natal (Ridgw. Pl. XL. 13'''. OY-O, k), que, com o decorrer do tempo, passa ao pardo cravo (Ridgw. Pl. XL. 17'''. O-Y, m) mais perceptível pelo reverso. Neste meio o aspecto delas é ainda mais semelhante ao das de *Piedraia hortai*. Aos 40 dias de idade, as culturas medem, longitudinalmente, cerca de 4,5 cms., e, transversalmente, 2,0 cms., atingindo as paredes do tubo.

d) Em batata glicerinada.—As culturas, de oito dias de idade, apresentam pequenas proeminências mamilares, são bastante desenvolvidas e com aspecto de camurça. A coloração oscila entre o camurça olivar intenso (Ridgw. Pl. XL. 21'''. O-YY, b) e o olivar intenso (Ridgw. Pl. XL. 21'''. O-YY), esta nas mais antigas. Difunde-se pelo substrato um pigmento que varia entre os matizes avelaneado (Ridgw. Pl. XL. 17'''. O-Y, b) e o pardo madeira (Ridgw. Pl. XL. 17'''. O-Y—wood-brown), na porção juxta-cultural, e que se esmaece gradativamente à medida que dela se afasta. No decorrer do tempo todo o substrato é recoberto pela cultura, que se torna glabra, passando à coloração negra; dentro dos 40 dias, apresenta ainda as mesmas proeminências mamilares, sendo estas formações delimitadas por sulcos pouco profundos.

e) Em cenoura glicerinada.—Aos 16 dias, apresentam o aspecto das culturas em batata glicerinada. A coloração delas oscila entre o pardo citrino (Ridgw. Pl. XL. 21'''. O-YY, i) e o olivar intenso (Ridgw. Pl. XL. 21''', O-YY, k). O pigmento que se difunde no meio cultural é pardo acamurçado (Ridgw. Pl. XL. 17'''. O-Y, i). No fim de algum tempo a cultura estende-se por toda a superfície do substrato.

f) Em excremento de cavalo (conforme Langeron).—Apresentam-se, aos 12 dias de idade, como pequenos tufo penujosos, com o aspecto de pelucia e de coloração pardo citrina (Ridgw. Pl. XL. 21'''. O-YY, i).

g) Em grãos de arrôz.—Aos 12 dias, pequenos tufo penujosos, ave-ludados, de coloração camurça olivar (Ridgw. Pl. XL. 21'''. O-YY, d).

h) Em grãos de cevada.—Aos 12 dias, pequenos tufo penujosos, comparaveis á pelucia, de coloração camurça olivar ou camurça olivar intenso (Ridgw. Pl. XL. 21'''. O-YY, b).

Estudo micologico—1) Gota pendente em caldo de Sabouraud glicosado—Dentro das 24 horas já se notava o aparecimento de tubos de germinação, que atingiam grande comprimento, a partir das conidias transplantadas no meio. Cada celula da conidia dava origem a tais formações e, ás vêses, de uma das celulas originavam-se dois tubos; dentro de 48 horas estes tubos de germinação tornavam-se ramificados e apareciam então septos que os dividiam em segmentos (est. LXXXVI, figs. 1 a 5). Aos quatro dias já se notava o aparecimento de algumas fórmias micelianas um tanto diferenciadas, e que a meu vêr, evoluíam para conidioforos (figs. 6, 7, 8, 8a, 9, 10, 11 e 12), pois tornavam-se um tanto acastanhadas, ora em fórmula de espigas, ora fusiformes, longas, terminando em ponto afilada, originando-se lateralmente e ás vêses alternadamente nas hifas. Alguns davam origem a um filamento miceliano fino que se anastomosava a outro filamento que se encontrava situado para cima dele. Depois de fazer voltas caprichosas, prendia-se, em seguida, a um outro filamento mais distante (fig. 13). Estes filamentos, na nossa opinião, representam o papel de *órgãos fixadores*. Outros filamentos tornam-se conidioforos definitivos (figs. 14, 15, 16, e 17), que, com o correr do tempo, se apresentarão mais septados e darão origem ás conidias. Originariamente uma só conidia apresenta-se, na extremidade do filamento, a partir do 6º dia, sob a fórmula de pequenas ampolas ovoides ou fusiformes (figs. 18, 19, 20, 21, 22 e 23). Hifas septadas, hialinas ou sub-hialinas constituem grande parte destas culturas e ficam mergulhadas no meio cultural. Desta data em diante, este processo de estudo mostrou-se inconveniente, pois o cogumelo sofria uma especie de inibição no seu desenvolvimento.

2) Fragmentos de culturas dissociadas em lactofenol de Amann e potassa a 40 %—Cultura de 13 dias em Sabouraud glicosado.—Além do micelio esteril hialino, encontram-se hifas de coloração parda com o aspecto de conidioforos e assim interpretadas, pois muitas ainda suportam conidias, que apresentam a mesma coloração, com esterigmas ou não (figs. 24 a 31).

Algumas vezes a extremidade terminal do conidioforo apresenta uma dilatação em coronha (figs. 24 e 25), ou formação caprichosa como na fig. 73. As conidias, nesta ocasião, são bastante variaveis quanto a fórmula, dimensão e numero de septos que as dividem; assim é que as encontramos

subovoides, ovoides, clavadas, fusiformes, oblongas, ou em espiga, terminando algumas vezes em ponta; suas dimensões oscilam entre um comprimento máximo de 19 micra, 5, raramente atingido, ao mínimo de 7 micra, sendo a média de 12 micra, 941 (entre 45 conídias contadas); a largura máxima de 5 micra e mínima de 2 micra, 5, sendo, em média de 3 micra, 95; quanto ao número de septos, ora são unicelulares, não os apresentando, ora 2, 3, 4 e 5—celulares contendo, conseguintemente, 1, 2, 3 a 4 septos (figs., 31 a 48a.). Encontram-se também clamidosporos terminais e intercalares (fig. 74) e também pediculados, que não figuramos; raramente formações de hifas fortemente pigmentadas, que nos parecem anastomóticas, e que representamos na fig. 48.

3) Estudo das culturas desenvolvidas no substrato cultural e na parede do tubo.—Este processo é dos mais recomendáveis e permite acompanharmos o desenvolvimento completo do cogumelo *in loco*, sob a objetiva do microscópio e através da parede do tubo, empregando, para isso, aumentos convenientes. (Aconselhamos para este fim a ocular compensadora 18 e a objetiva B de Zeiss). Por este processo conseguimos observar várias formas de disposição das conídias nos respectivos conidioforos, formas estas facilmente alteráveis e destruídas, quando examinadas entre lamina e laminula com lactofenol ou potassa. Assim é que, em Sabouraud com mel de abelhas, ao 23º dia, o cogumelo em estudo apresenta-se-nos, ora com o tipo de frutificação encontrada nas *Acrotheciaceas*—acrogeno-verticilado—suportando o conidioforo de 1 a 6 conídias, (figs. 49 a 59 e fig. 70), ora com o tipo definitivo e característico do género *Spondylocadium*, isto é, de conídias originando-se lateralmente dos conidioforos, verticilo-pleurogenas, ás véses alternadamente, para cima da porção média do conidioforo (figs. 60 a 63). As dificuldades encontradas, quanto ao desenho das mesmas, não nos permittiram figurar outras formas de frutificação mais abundantes do que as apresentadas. Aos 27 dias, grande número de conídias, apenas ainda ao conidioforo, começam a emitir tubos de germinação, como exemplificamos (figs. 64 e 75), tubos estes que, por se entrelaçarem e se acharem tão fortemente pigmentados, não nos permitem distinguir com nitidês as componentes do cacho. Conseguimos, com grandes precauções, desenhar, com maior aumento (oc. comp. 6, obj. E. (Zeiss)), três corpos de frutificação quasi completos, provenientes de fragmento de cultura de 60 dias em meio de Sabouraud maltosado, e ligeiramente dissociado em lactofenol (figs. 65 a 67 e fig. 71). Nestas figuras podemos observar com nitidês a constrição existente na porção média das conídias. A fig. 68 mostra, ainda, um tipo de frutificação semelhante ao encontrado no género *Acrothecium*. Representámos na fig. 72 uma arboriza-

ção terminal de hifa aerea esteril. Na fig. 69, uma frutificação do tipo *Hormodendrum* encontrada em cultura de 23 dias, em excremento de cavalo.

CONSIDERAÇÕES.—Antes de atingir sua morfologia definitiva, passa o cogumelo em estudo por fases evolutivas que fazem lembrar as de *Dematiaceas* pertencentes aos seguintes generos: *Acrothecium* Preuss, *Dendryphium* Wallr, *Helminthosporium* Link e *Hormodendrum* Bon. Aproxima-se do genero *Acrothecium*, por isto que nele encontramos, frequentemente, as fórmãs de frutificação figuradas nos nossos desenhos numeros 54 a 59, bem como a coloração e não ramificação dos conidioforos, que tambem não são ramificados neste genero e naquele em que fomos levados a classifica-lo, isto é, *Spondylocladium*; as fórmãs de frutificação figuradas em 24, 25, 50, 51 e 53 fazem lembrar bastante as dos *Dendryphios*, principalmente a fig. 53, por causa da especie de nodosidade terminal que suporta a frutificação; do genero *Helminthosporium*, pelas fórmãs representadas nas figs. 26, 27, 28, 29 e 30, e ainda por suas fórmãs jovens (figs. 18, 19, 20, 21 e 22). Além disto as conidias pleuricelulares ainda mais o aproximavam destes generos. Com o genero *Hormodendrum*, por certos tipos de frutificação, como o figurado em o desenho nº 69.

Sómente mais tarde, quando o cogumelo atingiu pleno desenvolvimento, foi-nos possivel, devido ao seu aspecto definitivo, chegarmos á sua classificação. Assim é que as conidias, originadas primeiramente no apice dos conidioforos, isto é, acrogenamente, depois, isto é, no 23º dia, apareciam desde um pouco acima da parte média dos mesmos até ao apice, dispondo-se no conidioforo irregular, alternada ou pleurogenamente.

E cabe, a nosso vêr, no genero *Spondylocladium*, por corresponder á sua diagnose: *Hyphae steriles repentes, septatae; fertiles erectae, simplices, rigidulae. Conidia verticillatopleurogena, fusoides, typice 2-septata, fusca*, genero este que Saccardo coloca na tribu das *Acrothecieae*, e com razão, visto o que atrás já ficou referido, quando passámos em revista os tipos de frutificação por nós assinalados. Lindau, no tratado de Engler e Prantl (*Die natuerlichen Pflanzenfamilien I. Teil Abt. p. 476*), coloca o o genero *Spondylocladium* entre as *Dematiaceae—Phragmosporeae* e dele dá, a pagina 480, a diagnose seguinte: *Spondylocladium* Mart.: *Hyphen kriechend, septiert. Conidientraeger aufrecht, unverzweigt, etwas starr. Conidien seitlich wirtellig stehend, spindelformig, meist dreizellig, dunkel gefaerbt*, e refere-se, como Saccardo, a quatro especies, mencionando sómente as duas seguintes: *Spondylocladium fumosum*, encontrada em ramos putrescentes, na Inglaterra e na Allemanha, e a *S. atrovirens*, em batatas cortadas (machucadas ?), na Austria, ambas saprofitas. No *Sylloge*

fungorum encontrámos as diagnoses mais completas das duas especies referidas e retirámos os seguintes caractéres, de que lançámos mão para differenciar a especie considerada:

<i>Spondylocladium fumosum</i>	<i>S. atrovirens</i>	<i>Spondylocladium</i> n. sp.
Culturas: escuro-negrescentes	Olivaceo-escuras.	Olivaceas, olivaceo intensas, finalmente negras Primeiramente, filamentosas e, quando antigas, glabras.
Comprimento dos conidioforos: ? μ	500 μ	34 a 55 μ
Conidioforos: pelucido - castanhos, não ramificados, septados, rigidos, eretos.	Verde-escuros, septados, não ramificados, rigidos, eretos.	Castanho-escuros, septados, rigidos, eretos, inicialmente em forma de espigas (figs. 6, 7, 8, 8a, 9, 11 e 12).
Conidias: Fusiformes, arredondadas, verticiladas, dispostas, 3 a 3 ou 4 a 4, plasmadas bi ou tripartidas, em seguida biseptadas, ligeiramente constrictas, originando-se dos septos superiores das hifas.	Em forma de espigas, claviformes, sesses, subverticilladas, dispostas bi ou quaternadamente, 5, 6-septadas, não constrictas, com extrimidades agúdas, originando-se abaixo da porção média para a apical das hifas.	Clavadas, fusiformes, ovoides ou sub-ovoides e em espiga, apresentando ou não constrição na parte média, extremidades ora agúdas, ora arredondadas; pediculadas ou sesses, facilmente caducas. A's vezes alternas ou dispostas irregularmente, a principio fazendo lembrar a disposição encontrada no genero <i>Acrothecium</i> . Castanho-escuras, não até 4-septadas. Originadas, primeiramente, na porção superior dos conidioforos, em seguida um pouco acima da extremidade média dos mesmos.
Dimensões das conidias: 25 μ x 10 a 12 μ	60 μ	7 a 19 μ , 5 x 2 a 5 μ
Hifas estereis: rastejantes, septadas.	Rastejantes, septadas.	Rastejantes, tambem aereas, formando arborisações (fig. 72), septadas.

Estes caractéres diferenciais justificam plenamente, a nosso vêr, a criação de uma nova especie, pelo menos provisoriamente, até mais amplos informes. Resolvemos denomina-la *Spondylocladium atro-olivaceum* esta ultima designação proveniente da coloração das culturas, que, sendo primeiramente olivaceas, passam pelo olivaceo intenso e tornam-se negras, com o envelhecimento.

Provisoriamente, dissemos acima, por nos faltarem os dados comparativos referentes ás duas outras especies mencionadas por Lindau, no tratado de Engler e Prantl. Aos nossos colegas micologistas pedimos o obse-

quio de nos informarem sobre o assunto e a eles muito gratos, desde já, ficaremos.

Inoculações experimentaes—Ainda é cedo para darmos os resultados delas obtido.

Em todo caso, já podemos adiantar que um rato inoculado, hipodermicamente, com 0 c.c., 2 de suspensão, em solução fisiologica, de cultura de 22 dias de idade, em Sabouraud com mel de abelhas, apresenta, entre o 5º e 6º dia, dois nodulos na visinhança do ponto de inoculação e morre 22 dias após. Pela autopsia verificámos a presença dos dois nodulos supra-referidos, nos quais o exame microscopico revelou a existencia de filamentos micelianos, conservando ainda a pigmentação, bastante alterados, e grande numero de abcessos pulmonares. As culturas feitas com o material dos nodulos e com o pús dos abcessos foram negativas para o *Spondylocladium* e revelaram a presença de um *Oidium*, que não identificámos, e de *Staphylococcus albus*. Concluimos ter o animal falecido em consequencia de molestia superveniente.

Um coelho inoculado na mesma ocasião, intracutanea e hipodermicamente, nada de perceptivel revelou nos pontos inoculados, mas, 46 dias depois, apresenta emagrecimento notavel. Não sacrificámos este animal, mas o que nele observamos, será comunicado oportunamente.

Uma cobaia inoculada do mesmo modo que o coelho, isto é, intracutanea e hipodermicamente, revela-nos, 40 dias depois, um nodulo difficilmente perceptivel, em local visinho ao ponto de inoculação hipodermica, e nada no ponto de inoculação intracutanea.

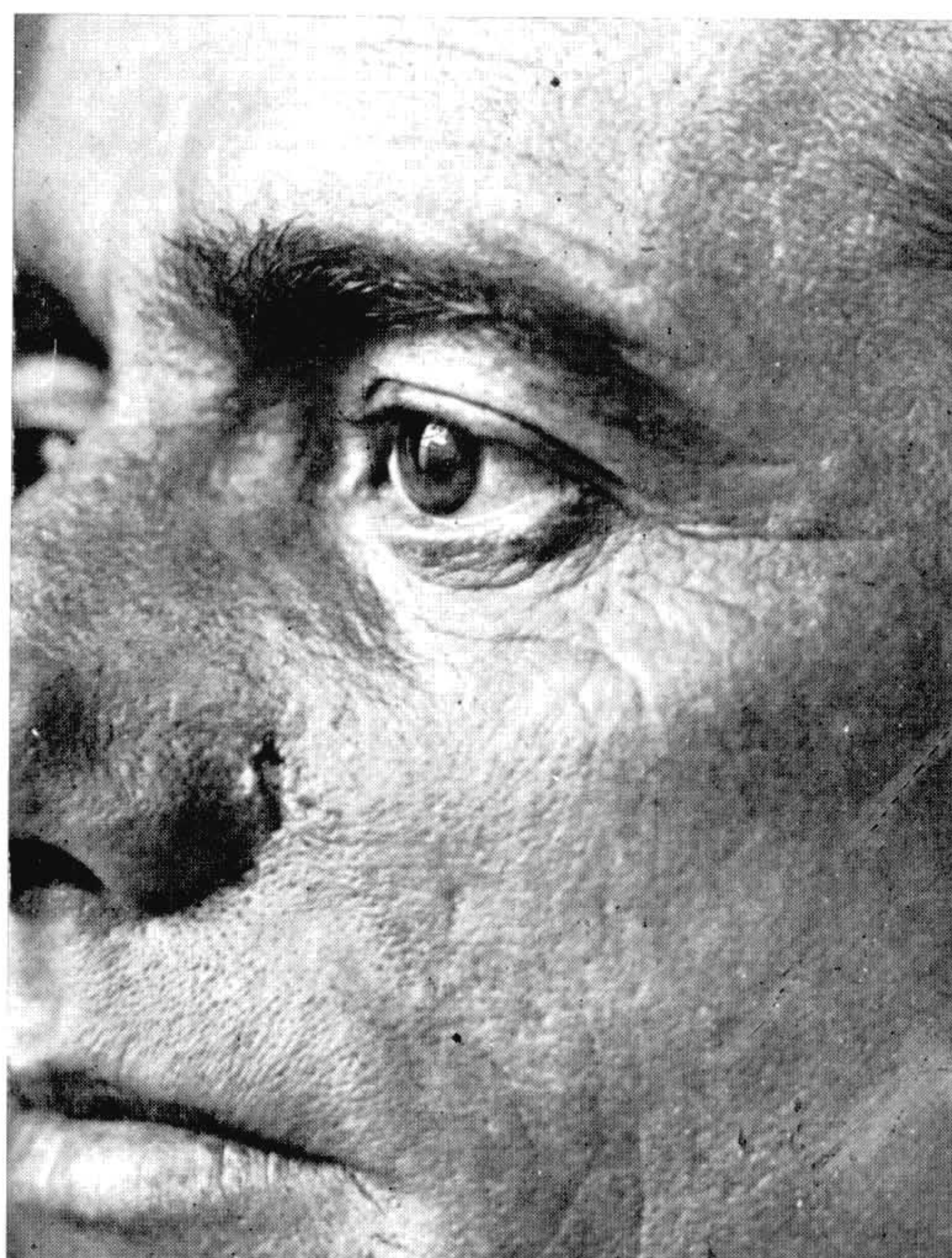
E', por consequencia, prematura qualquer apreciação a respeito das inoculações experimentais.

CONCLUSÃO

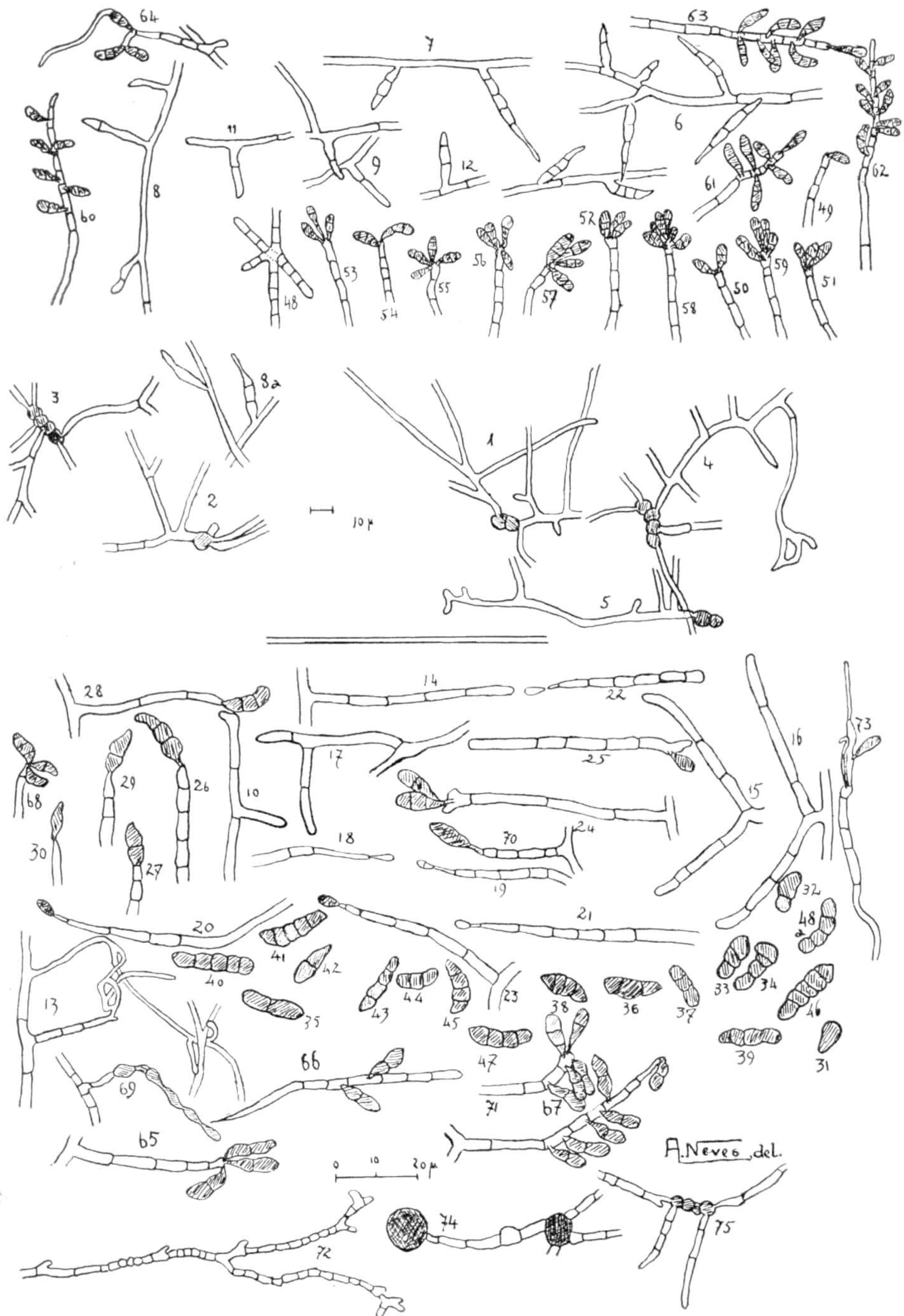
Descrevemos neste trabalho uma nova especie de *Spondylocladium* —*S. atro-olivaceum*—pertencente á familia das *Dematiaceae-Phragmosporae*, segundo Lindau ou á tribu das *Acrotheciae*, conforme Saccardo, do pús de lesões esporotricoides da face de um doente. Não podemos adiantar nada sobre o papel patogenico da *Demaciacea* descrita, pela impossibilidade da obtenção de córtes histo-patologicos de material das lesões e de outras provas necessarias a tal fim.

Pesquisas experimentais, por inoculações em animais, estão em andamento.

Nota — Para a explicação das figuras, consultar o texto.



Dr. Aroeira Neves : Novo hifomiceto.



Dr. Aroeira Neves : Novo hifomiceto.

BIBLIOGRAFIA

- ASHFORD, BAYLEY K. and CIFERRI, RAFFAELE:—A new variety of *Acrothecium obovatum*. *Micologia*. vol. XXII. July-August, 1930, n° 4, pp. 180-185 (with two text figures).
- BEURMANN et GOUGEROT:—Les sporotrichoses. Paris, 1912. Libr. Felix Alcan.
- CIFERRI, RAFFAELE:—Sur un *Acrothecium* isolé du «mal del pinto» mexican, *Acrothecium nigrum*, n. sp. *Ann. de Paras. Hum. et Comp.* T. VII, n° 6, 1.er nov. 1929, pp. 524-535.
- ENGLER, A. u. PRANTL, K.:—Die natürlichen Pflanzenfamilien usw. I. Teil. 1. Abteilung. 1900. S. 476-482, u. 466.
- LANGERON, M. et MILOCHEVITCH, S.:—Morphologie des dermatophytes sur milieux naturels et milieux à base de polysaccharides. *Ann. de Paras. Hum. et Comp.* T. VIII, nos. 3-4, 1.er Juil. 1930, pp. 422-436 e n° 6, 1.er oct. 1930, pp. 465-508.
- RIGDWAY, R.:—Color standards and nomenclature. 1912.
- SACCARDO, P. A.:—*Sylloge fungorum*, 1886. Vol. 4. pp. 482-3 et pp. 483-6.
-