

## DERMATOPATOLOGÍA

### Las Inclusiones de Rocha-Lima en la Verruga Peruana

[Dr. Javier Arias-Stella](#)<sup>(1)\*, \*\*</sup>  
Dr. Javier Arias-Stella C<sup>(2)</sup> \*, \*\*, \*\*\*

---

Folia. Dermatol. (Perú) 1996; 7 (3/4): 37-2

---

#### INTRODUCCIÓN

En 1913, Rocha-Lima<sup>(1)</sup> y Mayer y col.<sup>(2)</sup>, estudiando el caso de un sujeto que venía del Perú y que hizo una erupción cutánea a su arribo en Hamburgo, tuvieron ocasión de analizar varios nódulos de Verruga Peruana. Sobre la base de esta singular observación describieron la presencia, en las células del verrucoma, de «inclusiones» a las que consideraron como «clamidozoos». No obstante la relevancia de los investigadores y lo novedoso del hallazgo, llama la atención que en las décadas que siguieron, muchos de los investigadores que estudiaron con alguna profundidad esta enfermedad, no discuten este aspecto de la lesión verrucosa<sup>(3)</sup> y si bien algunos autores comentaron el tenla<sup>(4, 5, 6)</sup>, sólo recientemente se ha verificado la observación e intentado una explicación de su significado<sup>(7)</sup>.

Hemos tenido ocasión de estudiar, con algún detalle, esta curiosa manifestación de la Verruga Peruana y queremos en la presente nota hacer un sumario de nuestra experiencia y de lo registrado en la literatura.

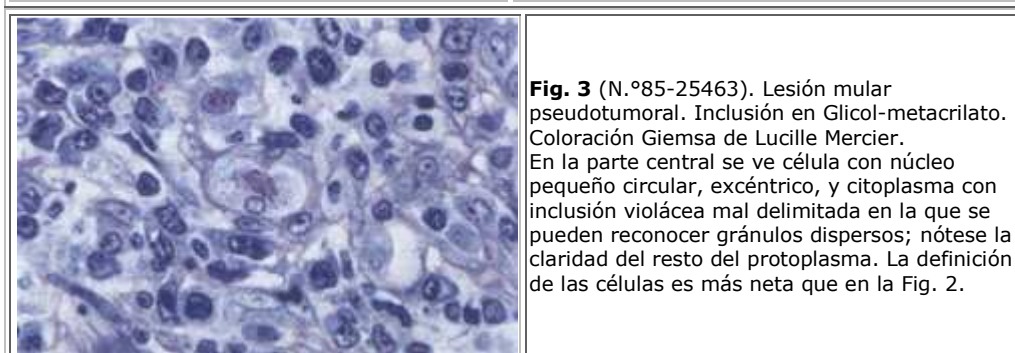
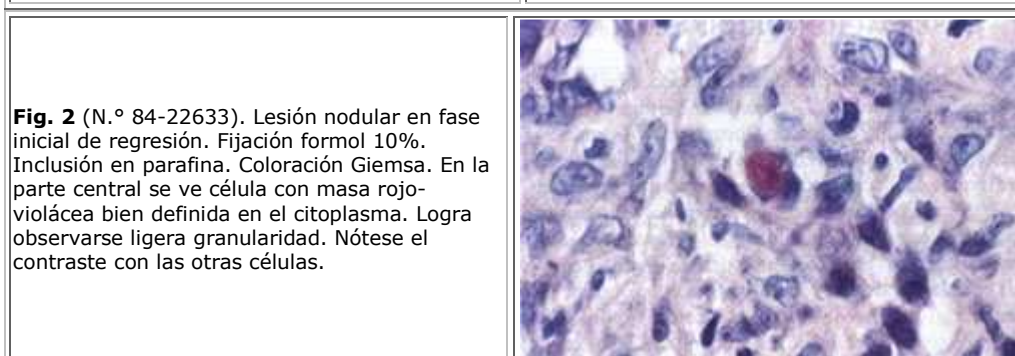
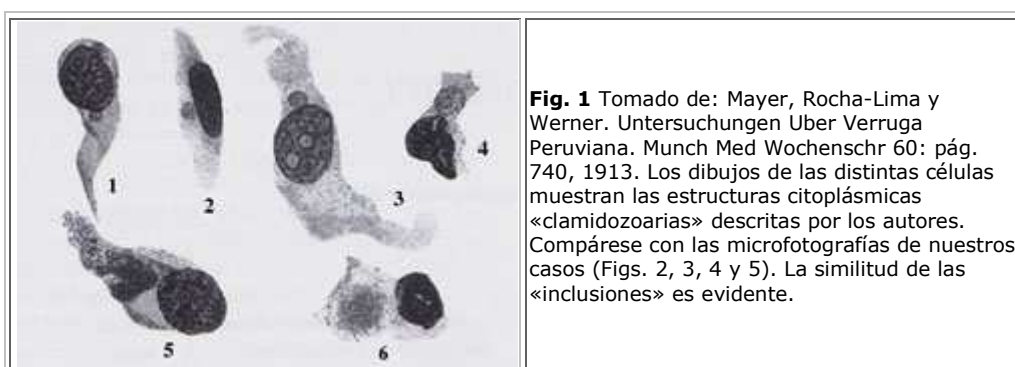
#### MATERIAL Y MÉTODO:

Se han estudiado treintisiete nódulos verrucosos que comprenden lesiones miliares, nodulares y mulares floridas y en regresión inicial o avanzada. Los tejidos fueron procesados de manera rutinaria. En siete casos se hizo investigación ultraestructural (gracias a la colaboración del Dr. Robert Erlanson del Memorial Center for Cancer de New York) y parte de los resultados obtenidos han sido previamente publicados<sup>(7)</sup>. Se usaron las tinciones de Hematoxilina-Eosina, PAS, Azul Alciano, Giemsa y Warthin-Starry. En algunos casos los tejidos fueron también incluidos en glicol-metacrilato usando el «JB-4 embedding kit Polysciences, Warrington PA»<sup>(8)</sup> y coloreados con la variante de la coloración de Giemsa desarrollada por Lucille Mercer del Laboratorio de Patología del "Memorial Center for Cancer" o en New York<sup>(7)</sup>.

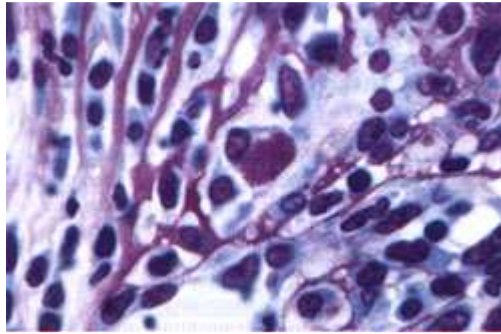
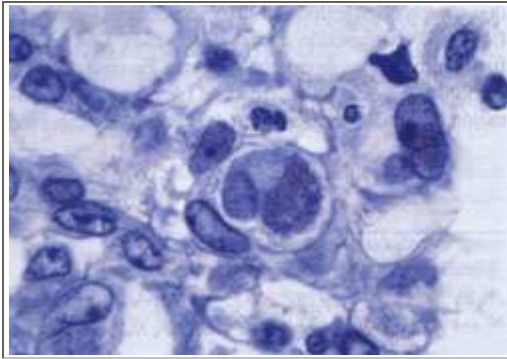
#### LA OBSERVACIÓN ORIGINAL:

Como hemos señalado en la introducción Mayer, Rocha-Lima y Werner<sup>(2)</sup> en cortes de Verruga Peruana, coloreados con la técnica de Romanowsky-Giemsa<sup>(9)</sup> describen en las células endoteliales proliferadas «cerca o alejadas del núcleo inclusiones citoplásmicas rojizas de estructura homogénea o, más a menudo, constituidas por conglomerados de gránulos mal delimitados». Subrayan que estos gránulos son distintos a los de las células cebadas y otros leucocitos y afirman que las inclusiones no pueden interpretarse como fenómenos degenerativos. Concluyen que son similares a los cuerpos observados en el Tracoma, «Bird pox», **Molluscum Contagiosum** y otras enfermedades.

Mayer, Rocha-Lima y Werner ilustraron su publicación con dibujos mostrando las células con inclusiones tal como las observaron en los frotises de los verrucomas. La **Fig. 1** reproduce estos dibujos del trabajo original.

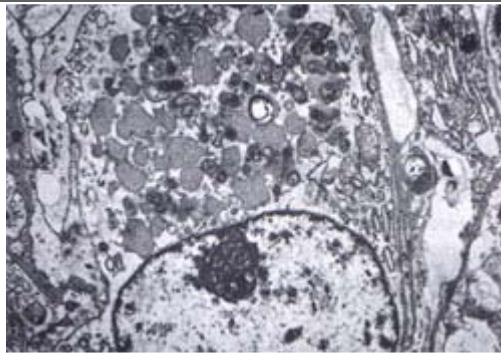
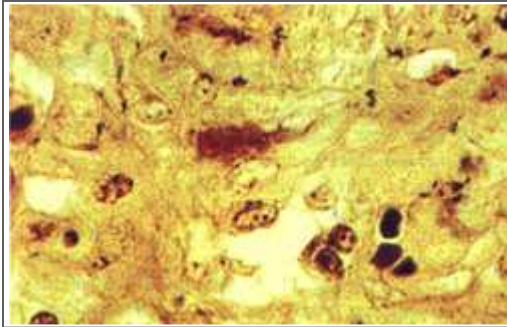


**Fig. 4** *Idem* a Fig. 3. La inclusión aquí es piriforme y bien delimitada; la granularidad es intensa; el contraste con el color azul-cielo del citoplasma es notable.



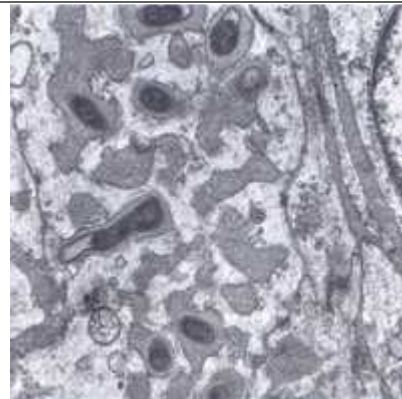
**Fig. 5** *Idem* a Fig. 3. La inclusión comprende casi todo el citoplasma, es rojo-púrpura y muestra una homogenización de los gránulos que son menos perceptibles que en Fig. 4. Nótese que el núcleo tiende a la picnosis.

**Fig. 6** (N.º85-25463). Fijación en formol al 10%. Inclusión en parafina. Coloración de Warthin-Starry. Inclusión con contorno irregular y aspecto homogéneo con esparcidos gránulos. El contraste con el fondo amarillento es definido. Nótese algunos microorganismos bacilares intersticiales o sobre las células vecinas.



**Fig. 7** Célula endotelial con múltiples vacuolasfagocíticas. En ellas se ve bacterias lisadas y matriz de sustancia fundamental. En la parte superior se ve una bacteria cortada transversalmente (contorno circular) en la sustancia matriz intersticial. Este es el aspecto ultraestructural de la «inclusión de Rocha-Lima». (Tomado de Am. J. Surg. Pathol. Arias-Stella y col. 10:59, pág. 607, 1986). X 7.900.

**Fig. 8** Inclusión de Rocha-Lima. Ultraestructura. Laberinto de cisternas conteniendo bacterias más o menos viables o degradadas y sustancia fundamental. Se puede reconocer el colágeno degradado dentro de las vacuolas. (Tomado de Am. J. Surg. Pathol. Arias-Stella y col. 10:59, pág. 608, 1986) X 19.760.



## **RESULTADOS:**

En cuatro de los treintisiete casos estudiados se encontró, en cortes coloreados con Giemsa <sup>(9)</sup>, inclusiones citoplásmicas del tipo descrito por Rocha-Lima y colaboradores. Estos cuatro ejemplos correspondieron a lesiones floridas o en regresión inicial, nodulares o mulares. La Fig. 2 ejemplifica el aspecto observado en las preparaciones incluidas, de manera ordinaria, en parafina y las Figs. 3, 4 y 5, muestran la apariencia en los casos incluidos en glicol-metacrilato y teñidos con la variante de la coloración de Giemsa de Lucille Mercer.

Lo primero que nos llamó la atención fue la baja incidencia de la presencia de inclusiones en relación con el número de casos estudiados y, de otro lado, el carácter focal y aislado de las mismas. Las inclusiones estaban presentes en algunas áreas y ausentes en grandes territorios. Con la coloración de hematoxilinaeosina no son identificables. La tinción con el PAS, después de la digestión con diastasa, las tiñe ligeramente, pero no toman el azul alciano. Como puede verse en la Fig. 6 el Warthin-Starry demuestra bien el contraste entre la tinción de la inclusión, que se ve negro-achocolatada, y el fondo amarillento homogéneo del resto del citoplasma.

Con el Giemsa se distinguen aún con baja magnificación por su coloración rojiza o púrpura que contrasta con la tinción azul-cielo del citoplasma de las células vecinas. Las inclusiones están constituidas por gránulos que se ven libres o formando conglomerados. Estos gránulos están rodeados de un material amorfo, de la misma afinidad cromática, que en conjunto hacen la unidad de la inclusión. Uno puede encontrar todos los estadios en el desarrollo de estos cuerpos, desde la presencia de pequeñas unidades citoplásmicas, hasta su fusión para constituir mayores y su conjunción entre ellas para formar conglomerados intercelulares. También es posible trazar lo que parece ser el ciclo evolutivo de estas estructuras. Desde células con unos pocos gránulos formando un conglomerado pequeño, mal definido, con un halo en la periferie, y luego unidades más grandes en las que los gránulos coalescen para formar masas amorfas que eventualmente pueden ocupar todo el citoplasma. Paralelamente a estos cambios la célula regresiona y la necrobiosis parece ser el final del proceso.

Nuestros estudios ultraestructurales demostraron que las inclusiones corresponden a células endoteliales fagocíticas -con uniones celulares rudimentarias y pocas lisosomas- en las que complejas invaginaciones de la superficie celular han originado un laberinto de canales interconectados y vacuolas en las que se ve bacterias y componentes de la sustancia matriz extracelular (Figs. 7 y 8). Algunas de las bacterias en estas vacuolas se ven degeneradas,, con zonas densas o clarificadas y figuras de inyelina. Muy raramente se vieron bacterias degradadas libres en el citosol<sup>(7)</sup>. Queda pues claro que las inclusiones de Rocha-Lima no tienen la estructura de los cuerpos elementales descritos en las enfermedades producidas por «clarnidozoos»<sup>(10, 11)</sup>.

## **DISCUSIÓN Y COMENTARIO:**

Es sorprendente que el tema de las inclusiones descritas por Mayer, Rocha-Lima y Werner<sup>(2)</sup>, que eventualmente recibieron la denominación de «inclusiones» o

«cuerpos» de Rocha-Lima, no haya merecido mayores investigaciones en los numerosos trabajos que han ido definiendo las características morfológicas de la verruga peruana. En el célebre informe de Strong y col. de la misión de Harvard<sup>(5)</sup> se duda del rol etiológico atribuido a las inclusiones y refiriéndose, específicamente, a los trabajos de los investigadores del Instituto de Enfermedades Tropicales de Hamburgo dicen: «No se ha dado ninguna prueba que sustente la naturaleza parasitaria de los gránulos observados por Rocha Lima en las células degeneradas». Al dar cuenta de sus propias investigaciones sobre la histología del verrucoma, subrayan que: «No se ha encontrado en las células cuerpos que puedan ser definitivamente identificados como protozoos u otro tipo de «microorganismos»<sup>(5)</sup>.

Da Cunha y Muñiz inoculan un mono (*Pseudocebus* sp) con Bartonellas provenientes de cultivos en medio de leptospiaras, que fueron enviados al Instituto Oswaldo Cruz, del Laboratorio de Noguchi en New York. Las inoculaciones se hicieron en la región superciliar intradérmicamente y por escarificación, obteniéndose, a los 22 días, la formación de nodulillos dérmicos. Frotises de estas lesiones, coloreados con Giemsa, mostraron células endoteliales con granulaciones citoplásmicas que los autores consideran similares a las inclusiones descritas por Mayer, Rocha-Lima y Werner<sup>(12)</sup>.

Rebagliati, basado en el estudio de frotises de material de verrucomas, niega la naturaleza clamidozoica de las inclusiones de Rocha-Lima y considera que ellas son simples degeneraciones celulares<sup>(4)</sup>.

En 1937, Pinkerton y Weinman<sup>(6)</sup>, en la segunda expedición de Harvard al Perú, estudian 10 nódulos verrucosos, procedentes de siete pacientes, usando la fijación de Regaud<sup>(13)</sup> y la coloración de Giemsa y señalan: «En varias verrugas, particularmente en aquellas que mostraban pocas células definitivamente llenas con Bartonellas, se encontró inclusiones rojizas que ocupaban del 10 al 75% del citoplasma. Estas estructuras, claramente definidas del resto del citoplasma azulado, eran finamente granulares y frecuentemente esféricas. Sin duda se trata de las estructuras descritas por Mayer, Rocha-Lima y Wemer y que ellos consideraron similares a clamidozoos. Vimos formas intermedias entre estas estructuras y definidas colonias de Bartonellas. No hemos podido discernir si es que ellas representan organismos degenerados o un estadio en el ciclo vital». Ilustran su trabajo con dibujos de células obtenidas por extendidos de una lesión cutánea.

De lo dicho se desprende que son pocas las directas observaciones sobre las inclusiones de Rocha-Lima. Un análisis crítico de las mismas nos indica, en primer lugar, que las inclusiones no se ven en todas las lesiones verrucosas. La observación original fue en

un paciente<sup>(2)</sup>. Strong y col.<sup>(5)</sup> y Pinkerton y Weinman<sup>(6)</sup> las encontraron en «algunos» casos. En nuestras investigaciones sólo las hemos observado en cuatro de treinta siete lesiones. Otros observadores no las mencionan<sup>(14, 15)</sup>. De aquí podemos concluir que se trata de un rasgo histológico que ocurre en una etapa de la evolución del proceso y que sigue un ciclo: ausencia---> presencia ---> desaparición. Esto es, sería un momento en la relación huésped-parásito. Por ello muchos observadores no las han encontrado.

Otra conclusión, derivada de la información acumulada, tiene que ver con las condiciones técnicas necesarias para visualizar las inclusiones. Todo indica que ellas no se ven en los cortes ordinarios coloreados con H-E. Se tiñen con el Warthin-Starry y tenuemente con el PAS después de la digestión con diastasa, pero es sobre todo con el Giemsa que ellas se hacen netamente visibles. En nuestras propias investigaciones, como queda ilustrado en el presente trabajo, hemos encontrado

que especiales condiciones de fijación y coloración producen aún mejores resultados.

Nos ha tocado demostrar de manera definitiva la naturaleza de las inclusiones al haber encontrado en la observaciones ultraestructurales, practicadas en los mismos casos donde se observaron las inclusiones al microscopio de luz, la presencia de etapas en el engolfamiento de bartonellas por prolongaciones citoplásmicas de células endoteliales, que a manera de los tentáculos de un pulpo envuelven a los organismos situados en los intersticios (**Fig. 9**).



**Fig. 9** Esquema que ilustra las etapas en el proceso de engolfamiento de los microorganismos intersticiales y de la sustancia fundamental que los rodea por las prolongaciones tentaculares de las células endoteliales

Lo curioso es que al producirse este atrapamiento queda incorporada también la matriz fundamental intersticial que rodea a las bartonellas. El resultado es que las cisternas que se forman contienen gérmenes en diverso grado de degradación y sustancia fundamental (Fig. 8). Lo anterior determina el aspecto de la inclusión al microscopio de luz. Si predominan los organismos viables, el aspecto será granular; si predominan las bartonellas degeneradas y la sustancia fundamental, el aspecto será amorfo y difuso.

Finalmente debemos preguntarnos ¿cuál es el significado de estas inclusiones?. No tenemos una clara respuesta. Una primera interpretación podría ser que ellas representan la etapa intermedia del proceso de regresión de la verruga en el que las bartonellas son fagocitadas dentro del mecanismo de superación de la infección. Si esto es así, llama la atención que no sea una imagen más frecuente, teniendo en cuenta la tendencia natural de la erupción a regresionar espontáneamente. La doctora Scavino ha planteado una similitud entre las inclusiones de Rocha-Lima y los cuerpos de Michaelis-Guttman de la Malacoplakia<sup>(16)</sup>. En la malacoplakia se postula una deficiencia en la actividad fagocítica de los macrófagos, como la causante de la acumulación de los detritus bacterianos que luego se calcifican<sup>(17)</sup>.

Si bien hemos encontrado bartonellas degeneradas y cuerpos mielínicos en las inclusiones de Rocha-Lima no hemos visto, ni nadie ha reportado la ocurrencia de calcificaciones o depósitos minerales en las inclusiones verrucosas. Sin duda, estamos delante de un interesante aspecto patogénico que requiere de ulteriores estudios. Recientemente, contrariando anteriores observaciones, hemos encontrado que la tinción de Warthin-Starry demuestra muy bien las Bartonellas en las lesiones verrucosas<sup>(18, 19)</sup>. Se ha abierto así un nuevo campo para la investigación sistematizada de la enfermedad y para poder ahondar en el estudio de esta interesante y singular reacción histológica.

## RESUMEN

Se investiga las características histológicas y ultraestructurales de las inclusiones descritas por Rocha-Lima en la Verruga Peruana, en treintisiete lesiones verrucosas que comprenden formas miliares, nodulares y mulares, floridas y en regresión inicial y avanzada.

En cuatro casos de lesiones nodulares o mulares floridas o en regresión inicial se encontraron las inclusiones citoplasmáticas en secciones coloreadas con la tinción de Giemsa.

Las inclusiones se observaron en las células endoteliales y estuvieron constituidas por gránulos más o menos definidos, rojizos, púrpura o violáceos, entremezclados con grados variable de sustancia amorfa de la misma colorabilidad. Estos dos elementos formaban unidades que se destacaban del resto azulado del citoplasma.

Las inclusiones se definieron mejor en los preparados incluidos en glicol-metacrilato y coloreados con el Giemsa modificado de Lucille Mercer.

Las inclusiones se ven también con definición con el Warthin-Starry, y menos definidas con el PAS-diasfasa. No se reconocen con hematoxilina-eosina.

El microscopio electrónico revela que ellas están constituidas por conglomerados de masa fundamental amorfa intersticial y bartonellas en degradación, que ocupan espacios cisternales formados por las prolongaciones citoplásmicas de las células endoteliales.

Se discute el mecanismo de producción de estas inclusiones y su probable significado en la evolución del proceso verrucoso.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. ROCHA-LIMA, H. Zur Histologie der Verruga Peruviana. *Verh Dtsch Ges Pathol* 16: 409-416, 1913.
2. MAYER, M., ROCHA-LIMA, H. WERNER, H. Untersuchungen über Verruga Peruviana. *Munch Med Wochenschr* 60: 739-744, 1913.
3. REBAGLIATI, R. Verruga Peruana (Enfermedad de Carrión). Imprenta Torres Aguirre, Lima, 1940 (ver bibliografía).
4. REBAGLIATI, R. Enfermedad de Carrión. Inclusiones celulares en los órganos hematopoyéticos y en los elementos cutáneos de la Verruga. *La Cron. Med. Lima* XXXII: 620,36-38, 1915.
5. STRONG, R. P., TYZZER, E. E., BRUES, C. T., SELLARDS A. W., GASTIABURU, J. C. Report of first expedition to South America (1913) Harvard School of Tropical Medicine. Cambridge, M. A. Harvard University Press, 1915.
6. PINKERTON, H., WEINMAN, D. Carrion disease. II Comparative morphology of the etiological agent in Oroya Fever and Verruga Peruana. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 37:591-593, 1937.
7. ARIAS-STELLA, J., LIEBERMAN, P. H., ERLANDSON, R. A. AND ARIAS-STELLA, J. Jr. Histology, Immunohistochemistry, and Ultrastructure of the Verruga in Carrion's Disease. *Am. J. Surg. Pathol.* 10: 595-610, 1986.
8. ASHLEY, C., FEDER, N. Glycol methacrylate in histopathology. *Arch. Pathol.* 81: 391-397, 1966.
9. ROMEIS, B. Gufa-Formulario de Técnica Histológica. Editorial Labor, Barcelona, 1936.
10. BEDSON, S. P., BLAND, JOW. A morphologic study of Psittacosis virus with the description of a developmental cycle. *Br. J. Exp. Pathol.* 13:461-466, 1932.
11. BLAND, JOW, CANTI, R. G. The growth of Psittacosis virus in tissue cultures. *J. Pathol. Bact.* 40: 231-241, 1935.
12. DA CUNHA, A. M. ET MUÑIZ, J. Recherches sur la Verruga Peruana Experimentale. *Compt. Rend. Soc. Biol. Par.* 97: 1368-1372.
13. KRAJIAN, A. A. AND GRADWOHL, RBH. *Histopathological Technic.* The C. V. Mosby Company, St. Louis, 1952.
14. TAKANO-MORÓN, J. Enfermedad de Carrión (Bartonellosis Humana). Estudio Morfológico de la fase hemática y del período eruptivo con el microscopio electrónico (Tesis doctoral). Lima, Perú. *Fec. de Med.* 1970.
15. RECAVARREN, S., LUMBRERAS, H.: Pathogenesis of the Verruga of Carrion's disease. *Ultrastructural Studies. Am. J. Pathol.* 66: 461-470, 1972.

16. SCAVINO, Y. Comentario. En la presentación del trabajo: «Nuevas observaciones sobre el reconocimiento en los tejidos del agente etiológico de la Verruga Peruana». Arias-Stella, J. y Arias-Stella C., J. XIV Congreso Nacional de Anatomía Patológica, Lima Oct. 25, 1996.
17. THORNING, D., VRACKO, R. MALACOPOLAKIA. Defect in digestion of phagocytized material due to impaired vacuolar acidification? Arch. Pathol. 99: 456-460, 1975.
18. ARIAS-STELLA, J. JR. AND ARIAS-STELLA, J. Warthin-Starry stain identifies Bartonella Bacilliformis in Verruga Peruana. Registered in the Program of the Annual Meeting, United States and Canadian Academy of Pathology, Orlando, Fl. March 1-7, 1997.
19. ARIAS-STELLA, J. YARIAS-STELLAC., J. Nuevas observaciones sobre el reconocimiento en los tejidos del agente etiológico de la Verruga Peruana. XIV Congreso Nacional de Anatomía Patológica, Lima, Oct. 25, 1996