

## Estudio inmunohistoquímico cuantitativo del índice de proliferación y de apoptosis en los comedones cerrados microquisticos en el acné vulgaris

*Quantitative Immunohistochemical Study of Proliferation Index and Apoptosis Index in Acné Vulgaris*

Raúl Vignale, Nelson Reissenweber

Departamento de Anatomía Patológica. Hospital de Clínicas "Dr Manuel Quintela". Montevideo. Uruguay

**Correspondencia:**

Raúl Vignale

Palmar 2542. CP 11600 Montevideo. Uruguay

Tel/Fax: (+59) 8 2 709 5230

e-mail: rvignale@adinet.com.uy

### Resumen

El acné vulgaris es una afección multifactorial del folículo pilosebáceo. La hiperqueratinización en el infrainfundíbulo constituye el primer elemento en la formación de comedones. Estudiamos 20 biopsias de pacientes con acné vulgaris que presentaban comedones microquisticos o cerrados en sus primeras etapas, con técnicas de inmunohistoquímica. Se efectuaron: el índice de proliferación (PCNA) y de apoptosis (TUNEL) en la unidad pilosebácea. Se compararon con 5 pacientes sin acné. No se estudiaron los comedones abiertos que son formas clínicas y histopatológicas diferentes en sus primeras etapas. Los estudios fueron efectuados en tres diferentes áreas de la unidad pilosebácea: epidermis de superficie cercana al ostium, epitelio del infrainfundíbulo y del ducto de la glándula sebácea. Los resultados evidenciaron que ambos índices están significativamente elevados en el infrainfundíbulo y en el ducto de la glándula sebácea, comparada con la epidermis del ostium. En estos comedones quísticos cerrados hay una mayor actividad mitótica y un mayor índice de apoptosis celular. Ambos elementos determinan un aumento de la "descamación" produciendo una hiperqueratosis en todo el folículo pilosebáceo. Esto sugiere que en la formación de estas clases de comedones, el folículo piloso, ducto y glándula sebácea funcionan y responden como una unidad en pacientes con acné. Señalamos que la hiperqueratinización en los primeros estadios de estos comedones cerrados, el ducto sebáceo es tan importante como en el infrainfundíbulo. Este fenómeno no sucede en las primeras etapas de los comedones abiertos.

(Vignale R, Reissenweber N. Estudio inmunohistoquímico cuantitativo del índice de proliferación y de apoptosis en los comedones cerrados microquisticos en el acné vulgaris. *Med Cutan Iber Lat Am* 2003; 31(4): 238-242)

**Palabras clave:** acné vulgar, hiperqueratinización infrainfundibular, ducto sebáceo, índice de proliferación, índice de apoptosis.

### Summary

*Acné vulgaris is a multifactorial common disease involving the pilosebaceous follicle. Hyperkeratinization in the infrainfundibulum constitutes the primary element in the formation of comedones. We studied skin biopsies of 20 patients with acné vulgaris with closed comedo or microcystic (Whitehead) for immunohistochemistry for determination of the Proliferation Index with PCNA and the apoptosis Index with TUNEL techniques. We compared with 5 biopsies with normal skin without acné for control. Only we studied this types comedones, not the open comedones (Blackhead) because they have different clinical and histopathological features. We studied three different areas of the epithelium of the pilosebaceous unit: epidermis of the surface close to the ostium, in the infrainfundibulum and the sebaceous duct. The results showed that both indices were significantly increased evaluated at the epithelium infundibular and the excreting duct of the sebaceous gland compared to the epidermis close to the ostium. We suggest that in cystic or close comedo exhibit a greater production and mitotic activity and a greater rate of cell apoptosis leading to an increased in desquamation "hyperkeratosis" in all the pilosebaceous follicle than in acné free. This means that the infrainfundibulum, the duct sebaceous and the gland operate and respond as a similar unit to form this types of comedo. It is very important the participation of the duct to produce the hyperkeratinization in the first stages of this close comedo as in the infrainfundibulum. For the contrary, this event not succeed in the first etages in the open comedo.*

**Key words:** acné vulgaris, hyperkeratinization infrainfundibular, sebaceous duct.

El acné vulgar (AV) es una afección multifactorial localizada en el folículo pilosebáceo. La hiperqueratinización a nivel del infrainfundíbulo constituye el elemento primario en la formación de los comedones. Estos están formados

por corneocitos con mayor cohesión producidos por una hiperproliferación celular a los cuales se asocian alteraciones en su composición físico-química. Esta proliferación-hiperqueratosis-retención a nivel infundibular es la causa

principal del comedón[1-12]. Algunos autores interpretan que la formación del comedón se inicia en forma primaria con una activa participación del conducto sebáceo, a los que se agregan simultáneamente los fenómenos localizados en el infundíbulo[6, 11, 13-21]. En este trabajo investigamos la multiplicación celular y la apoptosis de los queratinocitos a nivel del epitelio cercano al ostium folicular, en el infundíbulo y en el conducto sebáceo a fin de definir cuantitativamente uno de los mecanismos patogénicos primarios en la formación de estos tipos de comedones quísticos o cerrados.

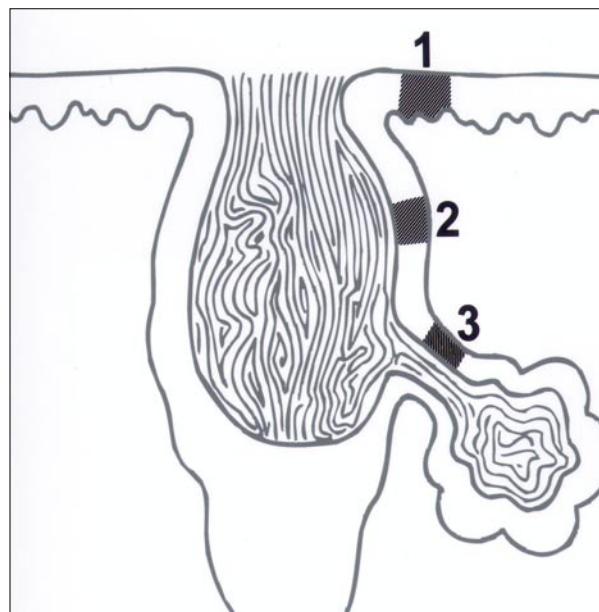
## Material y métodos

Las biopsias de piel se obtuvieron mediante punch de 3 mm de la región del cuello e interescapular de 20 pacientes con AV con comedones cerrados o microquísticos en sus primeras etapas, cuyas edades oscilaban entre 14 y 16 años de edad. Cinco pacientes portadores de lesiones névicas, que no tuvieron AV fueron los controles. Secciones de seis micras fueron obtenidas y montadas en láminas silanizadas. Cada cinco cortes, uno fue teñido con Haemalum-Eosina con el fin de evaluar la presencia de estos comedones en los folículos pilosebáceos. Las biopsias de pacientes con comedones abiertos en sus primeras etapas fueron descartados.

## Immunohistoquímia

**1) Índice de proliferación (IP).** Secciones de parafina fueron sometidas durante 8 m a una solución de buffer citrato (pH 6.0) en horno de micro-ondas. El antisero primario fue PC10 (Sigma, USA) al 1/60 durante la noche a temperatura ambiente. El Kit secundario fue el multivalente de Coulter (USA) y DAB fue usado como cromógeno. Las secciones fueron teñidas con Haemalum. El PCNA (Proliferation Cell Nuclear Antigen) y el índice de marcación fue determinado en cada área contando un mínimo de 500 núcleos y expresados como la relación de células positivas de todos los núcleos como porcentaje.

**2) Apoptosis (IA).** Esta apoptosis espontánea fue identificada histológicamente en cortes de parafina usando "in situ" procedimiento de marcado para la detección de la fragmentación del DNA nucleosomal usando la reacción de la "terminal deoxynucleotidyl transferasa (TdT) – mediante dUTP nick-end Labelling" (TUNEL)[22]. Para esto se uso la Apo-TAG Kit (Oncor, Gaithersburg MD) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Controles negativos para la apoptosis consistió en marcados en consecutivos secciones de cada caso en la cual la enzima TdT fué omitida. El índice de apoptosis (IA) fué calculado entre la proporción de células epiteliales teñidas



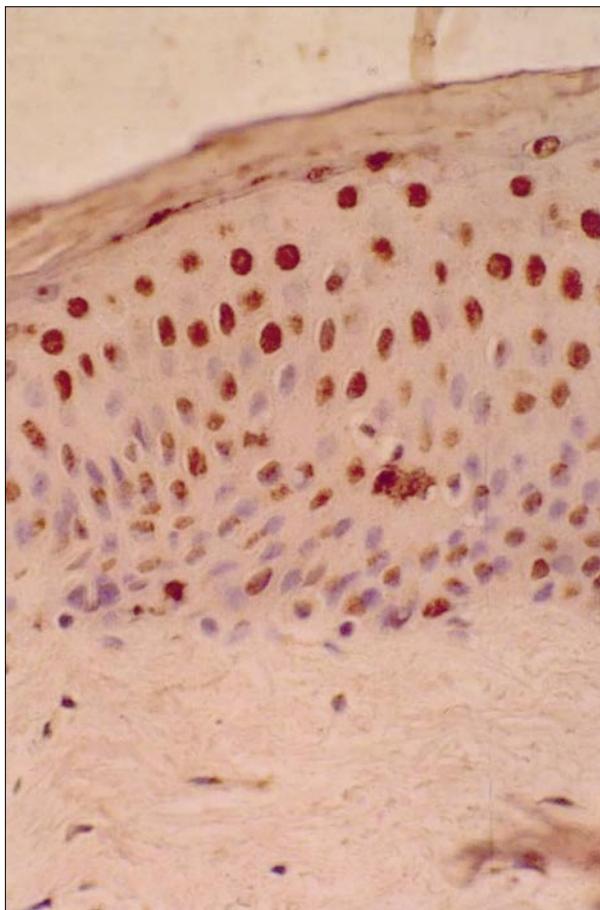
**Figura 1.** Esquema de la unidad pilosebácea mostrando las áreas seleccionadas para el estudio del IP e IA: 1) epidermis cerca del ostium, 2) epitelio del infundíbulo y 3) epitelio de la pared del conducto sebáceo.

positivamente entre todas las células epiteliales. Un mínimo de 500 células fueron contadas bajo el aumento de 400 x en cada área seleccionada. Tres áreas fueron elegidas para la evaluación para el IP y el IA de la unidad pilosebácea (Figura 1): 1) piel cerca del ostium del folículo pilosebáceo, 2) el infundíbulo y 3) en el ducto de la glándula sebácea. Los datos se expresaron en porcentaje  $\pm$  SD y analizados por el Test de Student.

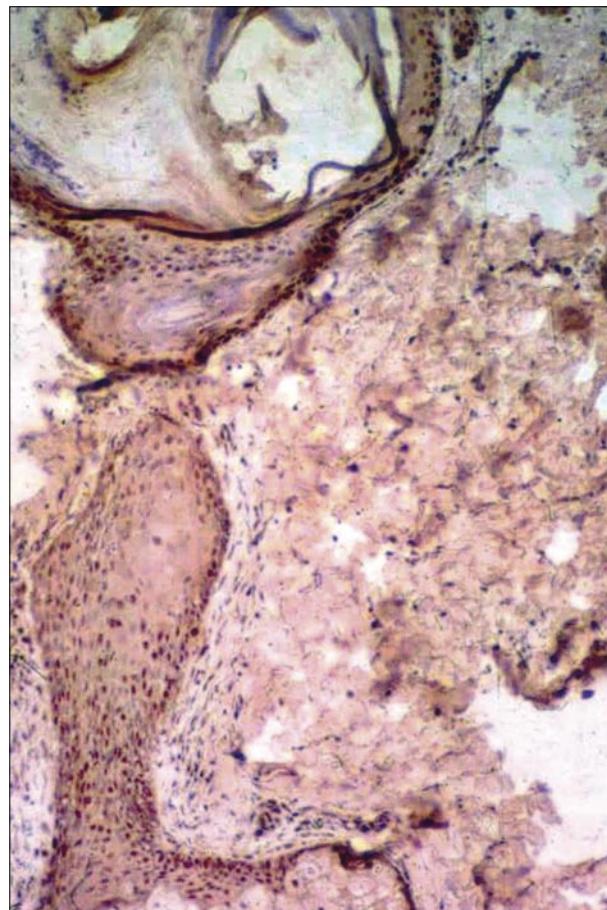
## Resultados

La distribución de los núcleos positivos con la técnica del TUNEL muestra que los mismos se agrupan hacia el área superficial de la capa epitelial en el ostium (Figura 2). Secciones de ducto sebáceo muestran con la técnica del TUNEL que los núcleos están cerca de la luz (Figura 3). Cuando se detecta la actividad del PCNA en el infundíbulo los núcleos positivos se distribuyen preferentemente en posición basal y parabasal (Figura 4).

En la Tabla 1 se observan los valores porcentuales de los índices de proliferación y de apoptosis en la epidermis cercana al ostium, en el infundíbulo y en el ducto sebáceo. Es evidente que ambos índices están significativamente aumentados en esas áreas en comparación con la epidermis cercana al ostium ( $p < 0.05$ ).



**Figura 2.** Sección de la piel cerca del ostium de la unidad pilosebácea. Detección de la actividad apoptótica (TUNEL) en la parte superficial del epitelio.



**Figura 3.** Sección del ducto sebáceo (arriba el infrainfundíbulo y abajo la glándula sebácea) con la técnica del TUNEL. Aparecen numerosos núcleos preferentemente cerca de la luz indicando la intensa actividad.

**Tabla 1:** Índice de proliferación (PCNA) e índice de apoptosis (TUNEL) en los comedones cerrados microquísticos en pacientes con acné vulgaris.

	Índice proliferativo (PCNA)	Índice apoptosis (TUNEL)
<b>OSTIUM*</b>	17.2% $\pm$ 3.2	12.4% $\pm$ 4.3
<b>INFUNDÍBULO**</b>	25% $\pm$ 3	29.2% $\pm$ 7.5
<b>DUCTO SEBÁCEO***</b>	26.4% $\pm$ 4.2	21% $\pm$ 6.3

N=20

\* vs \*\* y \* vs \*\*\* p < 0.05

\*\* vs \*\*\* No Significativo

En la Tabla 2 se registran los valores de IP y IA en las mismas áreas de pacientes sin acné. No existen aquí diferencias significativas en los índices de las distintas áreas. Cuando se comparan los valores de los índices en pacientes

con acné y sin acné (Tabla 1 vs Tabla 2) se destacan aumentos significativos de todos ellos ( $p > 0.02$ ) en los pacientes con este tipo de comedones cerrados.

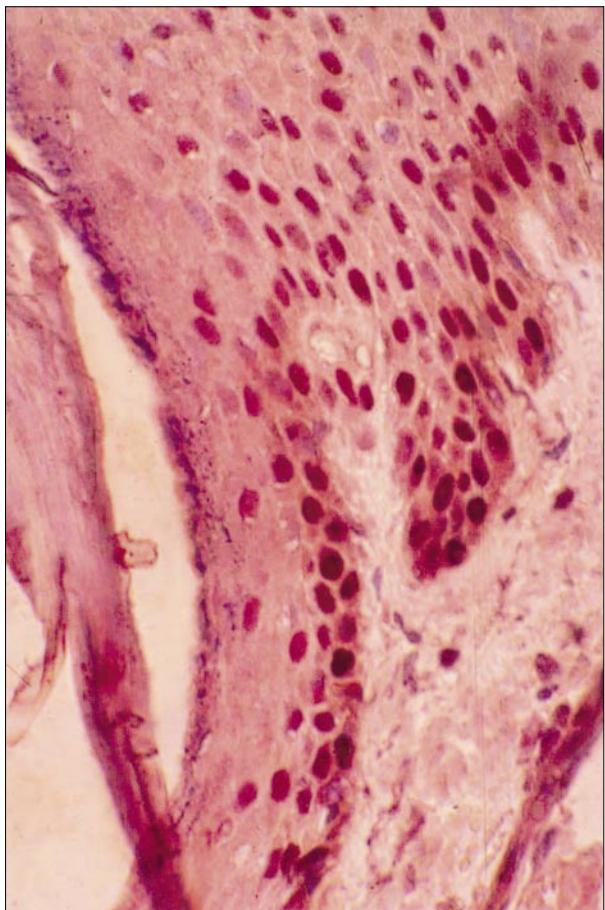
**Tabla 2:** Índice de proliferación (PCNA) e índice de apoptosis (TUNEL) en pacientes sin acné vulgaris.

	Índice proliferativo (PCNA)	Índice apoptosis (TUNEL)
<b>OSTIUM*</b>	8.4% $\pm$ 4.3	4.8% $\pm$ 2.5
<b>INFUNDÍBULO**</b>	9.6% $\pm$ 5.2	4.3% $\pm$ 3
<b>DUCTO SEBÁCEO***</b>	8.3% $\pm$ 6.2	7.3% $\pm$ 3.3

N=5

Tabla 1 vs Tabla 2 índice de proliferación (PCNA)  $p < 0.02$  (\*, \*\*, \*\*\*)

Tabla 1 vs Tabla 2 índice de apoptosis (TUNEL)  $p < 0.02$  (\*, \*\*, \*\*\*)



**Figura 4.** Sección del infundíbulo dilatado con hiperqueratosis central con actividad del PCNA con núcleos acumulados en posición basal y suprabasal.

## Comentario

La comedogénesis en el AV es un proceso donde la hiperqueratinización se inicia fundamentalmente en el infrainfundíbulo producido por una anormal descamación de los corneocitos que quedan retenidos en la luz, desencadenada por un aumento de la proliferación de dicha células epiteliales[1-12]. También puede intervenir en algunos tipos de comedones la queratinización parcial del ducto sebáceo[6]. Una demostración de este proceso son los trabajos donde se observó un aumento de la actividad mitótica del ciclo celular de los queratinocitos con 3H timidina[4] y con marcadores monoclonales Ki 67[9,,11] y K16[10]. Otros autores sostuvieron que la formación en la primera etapa de los comedones en el AV se inicia en el conducto de la glándula sebácea adyacente al infrainfundíbulo[13-20] o simultáneamente[6]. La participación del ducto es fundamental produciendo una hiperqueratinización diferente histoquímica a la del infrainfundíbulo[14-21]. Esto lo observamos en los distintos tipos de comedones. cerrados o abiertos[21]. Nuestro estudio muestra un aumento del IP de las células epiteliales tanto a nivel del folículo piloso como en los ductos de las glándulas sebáceas en este tipo de comedones cerrados microquísticos. Estudios previos de Knaggs et al.[8], usando Ki 67 para la evaluación del índice de proliferación halló valores aumentados en la piel cercana al ostium y en el infundíbulo en pacientes con acné comparados con controles. Cunliffe et al.[11] con el mismo monoclonal afirma estos conceptos demostrando además la participación del ducto de la glándula sebácea. Nuestro trabajo revela que ese aumento descrito a nivel del infundíbulo lo registramos en forma cuantitativa también en el ducto de las glándulas sebáceas en este tipo de comedones cerrados. En esta forma clínico-histopatológica, frente a diversas noxas, la unidad pilosebácea reacciona como un todo, tanto a nivel del infundíbulo como en el ducto. Este aumento simultáneo del IP y del IA puede interpretarse como un aumento de la producción y de la apoptosis de todas las células epiteliales con intensa descamación, tanto a nivel en el infrainfundíbulo como en los ductos sebáceos. En este fenómeno de la queratinización las células se acumulan paulatinamente en la luz de todo el folículo pilosebáceo, distendiéndolo y provocando estos comedones cerrados. Señalamos y es el motivo de este trabajo como hecho importante que esta patología se produce en este tipo de comedones cerrados en sus etapas iniciales que son diferentes a los comedones abiertos, donde se produce solo la hiperqueratinización en el infrainfundíbulo, sin la participación de la queratinización del ducto.

## Bibliografía

1. Kligman AM. An overview of acne. *J Invest Dermatol* 1974; 62: 268-87.
2. Knutson DD. Ultrastructural observations in acne vulgaris: the normal sebaceous follicle and acne lesions. *J Invest Dermatol* 1974;62: 288-307.
3. Shalita AR. Acne vulgaris. Current Concept in Pathogenesis and Treatment. *Int J Dermatol*. 1976; 15: 182-87.
4. Plewig G. Acne vulgaris: proliferative cells in sebaceous gland. *Br J Dermatol* 1974; 90: 625-30.
5. Plewig G. Morphologic dynamics of acne vulgaris. *Acta Dermatovener (Stockholm) Suppl* 89; 1980: 9-16.
6. Plewig G, Kligman AM. Sebaceous Glands. En: Acne and Rosacea. eds. 2nd. Springer-Verlag. Berlin. 1993: 33-37.

7. Leyden JJ. New understanding of the pilosebaceous of acné. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32: S15 – S25.
8. Janssen T, Plewig G, Kligman AM. Pathophysiology of acné. *Dermatologic Therapy* 1998; 6: 7-17.
9. Knaggs HE, Holland DB, Morris C, Wood ES, Cunliffe WJ. Quantification of cellular proliferation in acné using the monoclonal antibody Ki-67. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 89- 92.
10. Hughes BR, Morris C, Cunliffe WJ, Leigh IM. Keratin expression pilosebaceous epithelia in truncal skin of acné patients. *Br J Dermatol* 1996; 134: 247 – 56.
11. Cunliffe WJ, Holland DB, Clark SM, Stables GI. Comedogenesis: some new aetiological, clinical and therapeutic strategies. *Br J Dermatol* 2000; 142: 1084 – 1091.
12. Guy R, Kealey T. Modelling the infundibulum in acné. *Dermatology* 1998; 196; 32-7.
13. Van Scott EJ, MacCardle RC. Keratinization of the duct of the sebaceous gland and growth cycle of the hair follicle in the histogenesis of acné in human skin. *J Invest Dermatol* 1956; 27: 405 – 29.
14. González-Serva A. Sebolemmal keratinization: origin in the sebaceous gland duct of the cornified casing of the sebum plug. *J Cutan Pathol (Abstract)*. 1989; 16: 305.
15. González-Serva A. The sebaceous gland duct as the source of the sebolemmal keratinous casing of the sebum plug. *J Invest Dermatol (Abstract)*. 1990; 94: 530.
16. González-Serva A. The sebolith: an aneigenic follicular concretion (Abstract) *J Cutan Pathol* 1992; 19: 525.
17. González-Serva A. La patogenesia del acné: de un paradigma hiperqueratosico (comedon) a uno de calculosis folicular (sebólito). *Med Cutan Ibero Lat Am* 1996; 24: 11-25.
18. Sánchez Yus E. La unidad folículo-sebáceo-apócrina y sus quistes. *Curso de Dermatopatología*. Madrid. España. 1994
19. Simón RS, De Eusebio E, Alvarez-Vietez A, Sánchez-Yus E. Proliferaciones con diferenciación sebácea. I: Hamartomas. *Actas Dermo- Sif* 1998; 89: 577-90.
20. Borbujo Martínez JM. *Etiopatogenia del Acné Vulgar. Monografías de Dermatología. Acné I. Soto Melo J ed.. España. 1990, III. 18-25.*
21. Vignale R, Panuncio A. Clasificación histopatológica de los comedones en el Acné vulgaris. En prensa en *Dermatología Argentina* 2003.
22. Gabrieli Y, Ben-Sasson SA. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501.