

## Artigo de investigação

# Matricectomia da unha encravada do hálux: estudo imuno-histoquímico da matriz retirada

## *Matricectomy of the hallux's ingrowing nail: immunohistochemical study of the removed matrix*

### Autores:

Bherta M. Tamura<sup>1</sup>  
Benjamin Golcman<sup>2</sup>  
Luiz Carlos Cucé<sup>3</sup>  
Mirian N. Sotto<sup>4</sup>  
Neil F. Novo<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Doutora em Dermatologia pela Faculdade de Medicina da USP  
<sup>2</sup>Doutor em Cirurgia Plástica pela Faculdade de Medicina da USP  
<sup>3</sup>Livre-docente, doutor em Dermatologia pela Faculdade de Medicina da USP, titular do Departamento de Dermatologia da Universidade de Santo Amaro  
<sup>4</sup>Doutora em Patologia pela Faculdade de Medicina da USP e Pós-doutorado pela John Hopkins University  
<sup>5</sup>Doutor em Ciências, professor titular de Saúde Pública da UNISA

### Correspondência para:

Bherta M. Tamura  
Rua Ituxi, 58, apto 603  
Saúde - São Paulo, SP  
CEP: 04055-020  
Tel.: 55 (11) 5584-9354  
FAX: 55 (11) 5051-6961  
E-mail: tamurab@uol.com.br

### RESUMO

**Introdução:** A extensão lateral da matriz germinal da unha não é demonstrada na literatura. **Objetivo:** Identificar os limites laterais da matriz ungueal. **Material e métodos:** Avaliamos a área de proliferação da extensão lateral da matriz ungueal em amostras cirúrgicas resultantes da matricectomia para tratamento da unha encravada do hálux com o marcador imuno-histoquímico Ki-67. Obtivemos 21 amostras e observamos a epiderme, as regiões ventral e dorsal da matriz, bem como as matrizes ventral e dorsal do ângulo lateral/medial. **Resultados:** O teste de comparação múltipla demonstrou que o número de células na matriz ventral é maior que o número encontrado na pele, na matriz dorsal, no ângulo da matriz dorsal e no ângulo da matriz ventral. O número de células na pele e no ângulo da matriz ventral é maior que o número encontrado no ângulo da matriz dorsal. **Conclusão:** O limite lateral da matriz ungueal possui atividades proliferativas. A cirurgia realizada sem remoção completa da região proliferativa lateral/medial da matriz ungueal pode influenciar a taxa de recorrência de matricectomias. **Palavras-chave:** hálux, unha, imuno-histoquímica, procedimento cirúrgico ambulatorial.

### ABSTRACT

**Introduction:** The lateral extent of the germinal matrix area of the nail is not demonstrated in the literature. **Objective:** To identify the lateral limits of the ungueal matrix. **Material and methods:** We evaluated the proliferation area of the lateral extent of the nail matrix on surgical samples resulting from the matricectomy for the treatment of ingrowing nail of the hallux with the Ki-67 immunohistochemical marker. We obtained 21 samples and observed the epidermis, ventral and dorsal region of the matrix, as well as ventral and dorsal matrix of the lateral/medial angle. **Results:** The test of multiple comparisons demonstrated that the number of cells in the ventral matrix is higher than the number found in the skin, in the dorsal matrix, in the angle of the dorsal matrix and in the angle of the ventral matrix. The number of cells in the skin and in the angle of the ventral matrix is higher than the number found in the angle of the dorsal matrix. **Conclusion:** The lateral limit of the ungueal matrix has proliferation activities. The surgery performed without the complete removal of the lateral/medial proliferation region of the nail matrix may influence the recurrence rate of matricectomies. **Keywords:** hallux, nail, immunohistochemistry, ambulatory surgery procedure.

### INTRODUÇÃO

A unha encravada,<sup>1-3</sup> ou onicocriptose,<sup>1,2,4,5</sup> é uma doença crônica e dolorosa, localizada nas bordas de ambos os lados da unha, geralmente no hálux. Uma espícula na borda lateral da unha, em crescimento contínuo, causa ulceração da pele na falange distal<sup>6,7</sup> e a infecção pode ter início pouco tempo depois. O cuidado inadequado da região, a pressão crônica que causa irritação e o suor excessivo dos pés dentro de sapatos apertados estimulam o crescimento de tecido granulomatoso e da unha para dentro da pele do hálux.<sup>6</sup>

Alguns fatores podem contribuir para a determinação e evolução da doença, tais como as causas anatômicas,<sup>1,2,8-11</sup> as variações causadas por pressão interna,<sup>8,9</sup> as variações causadas por pressão interna devido a doenças associadas e doença das unhas,<sup>12-15</sup> drogas como os retinoides aromáticos, malformações anatômicas congênitas do hálux, além de distúrbios emocionais, alterações geriátricas (onicogribose, onicauxis, hiperqueratose subungueal), infecções e intoxicações.<sup>10,11</sup>

A doença afeta homens (68,5%) e mulheres (31,5%) na proporção de 2:1, especialmente entre a segunda e a terceira décadas de vida (15 a 40 anos de idade), com 73% sendo afetados entre as idades de 12 a 30 anos, exatamente em suas idades reprodutivas.<sup>16-18</sup> A invaginação da dobra lateral da unha ocorre em 72% a 84% dos pacientes, segundo Fowler.<sup>4,15,16,19</sup> Não há predominância do lado direito ou esquerdo do membro.<sup>10,11</sup> A unha encravada é duas vezes mais frequente entre os parentes de primeiro e segundo grau, sugerindo assim uma predisposição familiar, possivelmente devido a deformidades herdadas.<sup>16</sup>

As alterações observadas na dobra lateral da unha nessa condição mostram três tipos: (I) presença de eritema e edema leves; (II) presença de infecção e supuração e (III) presença crônica de tecido granulomatoso e hipertrofia.<sup>8</sup>

As duas primeiras podem ser tratadas mediante procedimentos conservadores, enquanto a terceira, e às vezes a segunda, requerem tratamento cirúrgico sob anestesia local ou geral.<sup>20,21</sup> A cirurgia deve ser evitada durante a fase inflamatória e infecciosa aguda, mas o tecido granulomatoso na fase crônica não é uma contraindicação para o procedimento cirúrgico<sup>20,22</sup> embora seja necessário avaliar o risco dos pacientes que sofrem de diabetes, vasculopatia por doença do colágeno, aterosclerose e outras doenças isquêmicas.<sup>23-25</sup>

O tratamento conservador apresenta uma alta taxa de cura (96%) para os tipos I e II, embora haja uma recorrência maior do tipo II e uma taxa de insucesso de 62% no tipo III a longo prazo. A taxa média de cura é de 50%.<sup>26</sup>

Quanto ao tratamento cirúrgico, a taxa de recorrência varia consideravelmente; vários estudos realizados em hospitais-escola atribuem esse fator aos médicos inexperientes nessa prática: a avulsão de parte da unha tem uma alta taxa de recorrência, variando de 50% a 83%, portanto, esse procedimento deve ser praticado.

Com o uso de fenol, a taxa de recorrência varia de 1% a 53%. Quanto à crioterapia com nitrogênio líquido, a taxa de recorrência varia de 16% a 35%. Com o uso de tubos plásticos e dispositivos de ranhuras, a taxa de recorrência foi calculada em 33-48% em um ano e com o uso de material dental e cliques, a taxa é de 23%.

A maioria das recorrências se deve à preservação da matriz ungueal com a queratinização sob diferentes formas: focos pequenos de queratina acumulada (removidos com agentes ceratolíticos); espículas pequenas e dolorosas que, quando trau-

matizadas, apresentam secreção e requerem tratamento local; múltiplas espículas ou o crescimento de uma placa ungueal separada sempre com aparência distrófica; o crescimento da placa ungueal no seu tamanho original (remoção insuficiente da matriz); ou mesmo o reposicionamento da placa ungueal, causando o desenvolvimento de unha encravada no lado oposto da placa. Essas espículas precisam ser novamente ressecadas e a área pode ser curetada com fenol ou até mesmo sofrer uma exérese cirúrgica.

A histologia da matriz ungueal e sua localização foram descritas por Lewin (1965), Achten (1968), Ackerman (1997), Cameli (1994) e Reardon (1999).<sup>3,15,27,28</sup> A matriz ungueal é dividida em dorsal, intermediária e ventral. A área proliferativa da matriz responsável pela unha é formada pela matriz intermediária e ventral e não pela matriz dorsal. As cristas epidérmicas possuem uma aparência abaulada, e o epitélio sofre uma redução do espessamento no leito da unha.<sup>27,28</sup>

O Ki-67 é um anticorpo monoclonal de rato (IgG classe 1) descrito em 1983 por Gerdes *et al.* Esse anticorpo pode ser usado para avaliar: as razões de crescimento dos tecidos normais, reacionários e neoplásicos, tais como o número de células em um ciclo celular; o índice proliferativo celular em amostras histológicas; a cinética celular e a eficácia de várias drogas tóxicas.<sup>29-31</sup>

O objetivo de nossa pesquisa foi identificar os limites laterais da matriz ungueal após a excisão das bordas laterais da unha encravada.

## MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e um pacientes do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foram incluídos após a aprovação dessa pesquisa pelo Comitê de Ética da mesma instituição. A faixa de idade dos pacientes variou de 8 a 57 anos, sendo 10 mulheres e 11 homens. Os pacientes apresentavam um quadro clínico típico de unha do hálux encravada, com indicação para tratamento cirúrgico.

Os pacientes com doença sistêmica, como diabetes, imunossupressão (medicamentosa ou infecciosa), doença vascular periférica, doenças de pele, defeitos congênitos ou qualquer outra doença que, de alguma forma, pudesse alterar a avaliação dos resultados dessa pesquisa foram excluídos do estudo. Os pacientes em nosso serviço sempre foram tratados com matriectomia após o insucesso dos tratamentos conservadores para as alterações dos tipos II e III.

Os espécimes excisados foram preparados prospectivamente, levando em consideração que eles foram imediatamente submetidos a métodos histológicos para estudo não-randômico, aberto e sem espécimes controles devido à natureza do procedimento e às considerações éticas.

Para este estudo, usamos a técnica cirúrgica de matricectomia como a seguir:

- 1) Assepsia do pé com iodo-povidona;
- 2) Anestesia regional dos nervos do hálux com injeção local de lidocaína a 2% sem epinefrina;
- 3) Exsanguinação e torniquete com dreno de Penrose;
- 4) Para a completa excisão em cunha da área afetada foram realizadas duas incisões. A primeira teve início em um ponto medial entre a cutícula e a dobra interfalangeana distal incisando toda a pele, estendendo-se distalmente pela placa ungueal e hiponíquio e finalizando na pele da ponta do dedo, 5 mm após o hiponíquio. A segunda incisão começou no mesmo ponto, contornando a matriz ungueal em um ângulo de aproximadamente 45°, estendendo-se paralelamente a primeira incisão pela dobra lateral e terminando no ponto final da primeira incisão. Ambas atingiram o plano justaosseo na sua profundidade.

A excisão em cunha foi iniciada pela parte distal englobando parte da pele da ponta do dígito, parte lateral da unha e espícula, leito ungueal, dobra lateral com granuloma e parte lateral da matriz ungueal.

- 5) Sutura primária da excisão fusiforme, usando um fio de mononylon 3-0, mantendo a borda da unha sob a placa ungueal;
- 6) Curativo compressivo sobre a unha do hálux;
- 7) Avaliação macroscópica da amostra cirúrgica e da área cruenta, confirmando assim a remoção da matriz proximal e da região lateral.

Para as avaliações histopatológicas e imuno-histoquímicas usamos os seguintes procedimentos:

- 1) A amostra cirúrgica geralmente descartada foi preservada em uma solução aquosa de formol a 10%, acondicionada com fosfato de sódio monobásico e dibásico;
- 2) Observou-se o prazo de 24 horas após o procedimento para a avaliação imuno-histoquímica;<sup>31</sup>
- 3) Para a preparação, as amostras cirúrgicas foram cortadas da seguinte forma: a primeira incisão foi feita no ângulo proximal da matriz (A), a segunda foi na prega proximal (B) e a terceira na distância média entre a prega proximal e o final do leito ungueal (C). Em amostras grandes, uma quarta incisão foi feita, dividindo o leito ungueal em terços médios proximais e distais (D). A placa ungueal foi cuidadosamente removida antes da incisão;
- 4) Os conjuntos de amostras das áreas das matrizes foram separados (A, B e C) e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina e preparadas com o marcador imuno-histoquímico. O marcador escolhido para este estudo foi o antígeno Ki-67 (Dako), clone Ki-S5, código

M7187 e lote 059. Foi utilizado o método indireto (Complexo Estreptavidina-biotina conjugado à enzima peroxidase).

A contagem do índice proliferativo escolhido para a avaliação da matriz ungueal em nosso estudo foi baseada em um artigo escrito por De Berker (1996),<sup>25</sup> no qual três sítios epiteliais foram examinados: a matriz, o leito ungueal e a polpa digital. O número de células marcadas foi contado em um compartimento de 100 células. Ele era composto por 25 células basais e por outras três camadas superiores de células, resultando em um conjunto composto por quatro camadas de células de 25 cada, em uma tentativa de reconhecer o compartimento proliferativo.

O índice de proliferação foi determinado como a seguir:

Índice Ki-67 = número de núcleos marcados por 100 células, no qual o índice de células marcadas é o número de núcleos celulares positivos dividido pelo total de 100 células contadas por área.

Na pele, a contagem foi triplicada, no entanto, na região ventral e dorsal da matriz, bem como na região ventral e dorsal do ângulo lateral/medial, a extensão do tecido era pequena, não sendo possível contar da mesma forma. Conseguimos uma dupla contagem na região ventral e dorsal da matriz, mas a contagem foi única na região do ângulo. Começando na bisetritz do ângulo, as 25 células correspondentes à área da matriz ventral e as 25 células correspondentes à área da matriz dorsal foram contadas, seguidas por três camadas superiores de células, chegando a 100 células, como proposto neste estudo.

Estatísticas não paramétricas foram utilizadas para analisar os resultados, levando em consideração a natureza das variáveis estudadas. A análise de variância proposta por Friedman<sup>32</sup> foi aplicada com o objetivo de comparar as cinco regiões submetidas ao estudo (pele, matriz ventral, matriz dorsal, o ângulo da matriz ventral e o ângulo da matriz dorsal), em relação à porcentagem de células marcadas com o Ki-67. Quando uma diferenciação significativa era visível, essa análise era complementada pelo teste de comparações múltiplas.<sup>33</sup>

## RESULTADOS

O índice proleferativo expressou uma média de 3,8 células por 100 células na epiderme. As quantidades mínimas e máximas são duas e oito células, respectivamente (Figura 1).

Na região da matriz ventral, 3 a 17 células foram detectadas (Figura 2), com uma média de sete células proliferativas por 100 células; e na região dorsal da matriz (Figura 3), o número variou de zero a oito células, com uma média de 3,4 células proliferativa por 100 células.

Na região da matriz ventral do ângulo lateral/medial, 1 a 12 células foram detectadas (Figura 4), com uma média de 4,9/100 células; e na matriz dorsal do ângulo lateral/medial

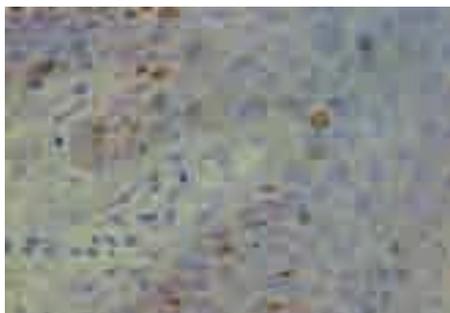


Figura 1 – Visualização da pele marcada com Ki-67. 400x.

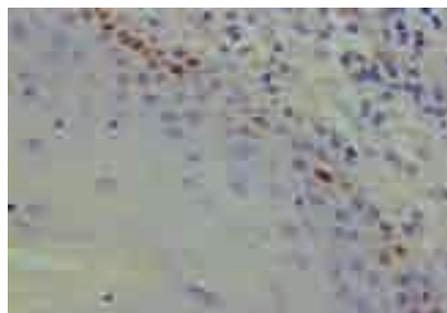


Figura 4 – Região da matriz ventral do ângulo. 400x.

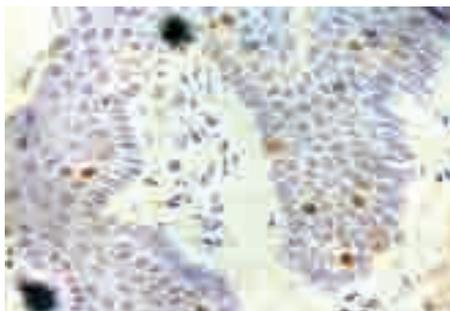


Figura 2 – Região da matriz ventral. 400x.



Figura 5 – Região da matriz dorsal do ângulo. 400x



Figura 3 – Região da matriz dorsal. 400x.

Tabela 1 – Representação de células marcadas com Ki-67 na pele, área da matriz ventral e dorsal e matriz dorsal e ventral do ângulo

Paciente	Pele	Matriz ventral	Matriz dorsal	Matriz ventral do ângulo	Matriz dorsal do ângulo
1	2	4	2	2	2
2	6	6	5	6	4
3	6	3	0	2	1
4	4	7	3	7	3
5	7	17	8	12	8
6	4	3	2	3	2
7	3	10	4	6	3
8	3	5	3	5	3
9	3	14	8	12	6
10	3	8	4	8	3
11	4	7	4	2	0
12	3	3	2	3	1
13	3	5	2	2	1
14	3	4	2	2	1
15	4	4	1	1	0
16	2	10	4	4	1
17	3	6	3	4	3
18	4	8	3	5	3
19	4	7	5	6	4
20	4	9	3	6	4
21	4	8	3	5	2
<b>Taxa média</b>	<b>3,8</b>	<b>7,0</b>	<b>3,4</b>	<b>4,9</b>	<b>2,6</b>

(Figura 5), o número variou de zero a oito células, com uma média de 2,6/100 células.

A Tabela 1 demonstra os pacientes que sofrem de unha encravada, de acordo com a percentagem do índice proliferativo do Ki-67 marcado na pele (matriz ventral, matriz dorsal, matriz ventral do ângulo lateral/medial e matriz dorsal do ângulo lateral/medial) observada nas amostras pós-matricectomia.

A análise de variância proposta por Friedman mostra que o  $X^2_R$  calculado = 56,16 ( $P < 0,001$ )  $X^2$  crítico = 9,49.

Pelo teste de comparações múltiplas, o número de células na matriz ventral foi maior que o número encontrado na pele, na matriz dorsal, no ângulo da matriz dorsal e no ângulo da matriz ventral; e o número das células da pele e do ângulo da matriz ventral também foi maior que o número encontrado no ângulo da matriz dorsal. Em nenhum caso houve recidiva.

O epitélio da região ventral com cristas epiteliais alongados era mais espesso; e na coloração com hematoxilina e eosina, a área apresentava um aspecto eosinofílico superficial, devido à presença de queratina e ausência da camada granulosa. A região dorsal, por outro lado, apresentou-se mal definida ou com ausência de cristais e papilas dérmicas com um fino epitélio.

## DISCUSSÃO

Nós obtivemos os resultados esperados; isto é, um maior número de células proliferativas nas áreas correspondentes à produção da placa ungueal na região ventral da matriz. Também evidenciamos que as células de proliferação dessa mesma matriz são difundidas até o ângulo lateral/medial da invaginação ungueal. Até o momento, não há estudos que descrevam o aspecto lateral da matriz ungueal.

Com base nestes resultados, podemos explicar a razão pela qual alguns casos de matricectomia mostram, depois de alguns meses, um corno cutâneo com características de uma unha recém-formada, localizada na lateral da cicatriz cirúrgica prévia. Em tais circunstâncias, o profissional provavelmente removeu apenas a matriz ungueal lateral, não incluindo a região do ângulo da matriz até a sua extremidade proximal. O tecido proliferativo residual continua produzindo a parte da placa ungueal, embora agora separada por uma cicatriz pós-operatória. Observamos também que a extensão lateral/medial da matriz ungueal segue a borda da placa ungueal, em oposição ao desenho esquemático apresentado por Mogensen.<sup>34</sup>

Ackerman<sup>35</sup> relata que a matriz lateral/medial está situada ao longo da placa ungueal, e Reardon<sup>28</sup> relata que a excisão cirúrgica deve ser feita dentro de uma área maior na região proximal da matriz. Algumas dúvidas ainda permanecem em relação à epidemiologia e outros agentes causais. No entanto, enfrentamos grandes dificuldades ao pesquisar o melhor método terapêutico, uma vez que os dados estatísticos registram taxas inferiores de recorrência em relação aos procedimentos conservadores, como a cauterização química, e taxas superiores de recorrência em relação às cirurgias um pouco mais agressivas.

Este estudo deve trazer uma contribuição adicional para a terapia cirúrgica da unha encravada, enfatizando a necessidade de se obter um conhecimento aprofundado da histologia normal da unha.

## CONCLUSÃO

O estudo clínico de nossos casos, a avaliação macroscópica e imuno-histoquímica da unha, bem como a estimativa da matriz lateral, dorsal e ventral das unhas encravadas nos levaram às seguintes conclusões:

O número de células na matriz ventral não difere significativamente do número de células no ângulo da matriz ventral.

A cirurgia realizada sem a remoção completa da região proliferativa lateral/medial da matriz ungueal pode influenciar a taxa de recorrência de matricectomias.

A falta de conhecimento em relação à histologia normal da unha provavelmente afeta a taxa de ineficácia dos procedimentos cirúrgicos recomendados para o tratamento da unha encravada.

O Ki-67 permite uma determinação segura da área retirada da matriz e do prognóstico e eficácia do tratamento cirúrgico, evitando um maior índice de recidiva. O limite lateral da matriz ungueal tem atividade proliferativa, e a não remoção cirúrgica completa da região proliferativa lateral/medial da matriz ungueal pode influenciar a taxa de recorrência de matricectomias.

## REFERÊNCIAS

1. Du Vries HL. *Surgery of the Foot*. St. Louis, The Mosby Company, 2 ed., pp. 203-211 and 211-3, 1965.
2. Dubois JPh. Un traitement de l'ongle incarné. *La Nouv Presse Méd* 1974; 3(31):1939-1940.
3. Baran R, Dawber RPR. *Diseases of the nails and their management*. Oxford: Blackwell Scientific, 2 ed., 1994, pp. 1-34.
4. Haneke E. Surgical treatment of ingrowing toenails. *Cutis*, 1986, pp. 251-256.
5. Siegle RJ, Harkness J, Swanson NA. Phenol alcohol technique for permanent matricectomy. *Arch Dermatol* 1984; 120:348-350.
6. Bose B. A technique for excision of nail fold for ingrowing toenail. *Surg Gynecol Obst*, 1971, pp. 511-512.
7. Wright AL. ABC of dermatology. Nails. *Br Med J* 1988; 296(9):106-7.
8. Heifetz CJ. Ingrown toenail. A clinical study. *Am J Surg* 1937; 38:298.
9. Heifetz CJ. Operative management of ingrowing toenail. *J Mo Med Assoc* 1945; 42(213).
10. Johnson KA. *Surgery of the Foot and Ankle*. New York: Raven, 1989, pp. 83-100.
11. Jahss MH. *Disorders of the foot and ankle. Medical and surgical management*. WB Saunders Company, 2 ed. Philadelphia 1991; 2(53):1573-1588.
12. Lathrop RG. Ingrowing toenails: causes and treatment. *Cutis* 1977; 20(1):119-122.
13. Fishman HC. Practical therapy for ingrown toenails. *Cutis* 1983; 32(155-160).
14. Hadley DL. The treatment of ingrowing and horny toenails. *Practitioner* 1985; 229:833-836.
15. Baran R, Bureau H. Congenital malalignment of the big toenail as a cause of ingrowing toenail in infancy. *Pathology and treatment (a study of thirty cases)*. *Clin Exp Dermatol* 1983; 8:619-623.
16. Langford DT, Burke C, Robertson K. Risk factors in onychocryptosis. *Br J Surg* 1989; 76:45-48.
17. Murray WR, Bedi BS. The surgical management of ingrowing toenail. *Br J Surg* 1975; 62:409-412.
18. Sykes PA, Kerr R. Treatment of ingrowing toenails by surgeons and chiropodists. *Br Med J* 1988; 297(30):335-336.
19. Gillette RD. Practical management of ingrown toenails. *Post Grad Med* 1988; 84(8):1145-1152.
20. Mogensen P. Ingrowing toenail. *Acta Orthop. Scandinav* 1971; 42:94-101.
21. Ceilley RI, Collison DW. Matricectomy. *J Dermatol Surg Oncol* 1992; 18:728-734.
22. Zuber TJ, Pfenninger JL. Management of ingrown toenails. *Office Procedures. Am Fam Physician* 1995; 52(1):181-90.
23. Lapidus P. The ingrown toenail. *Bull Hosp Joint Dis* 1972; 33(2):181-192.
24. Dixon GL Jr. Treatment of ingrown toenail. *Foot Ankle* 1983; 3(5):254-260.
25. De Berker D, Angus B. Proliferative compartments in the normal nail unit. *Br J Dermatol* 1996; 135:555-559.
26. Reijnen JAM, Goris RJA. Conservative treatment of ingrowing toenails. *Br J Surg* 1989; 76:955-957.
27. Hyder N. Ingrowing toenails: the extent of the germinal matrix. *J Bone Joint Surg [Br]* 1994; 76-B:501-502. Brief reports.
28. Reardon CM, McArthur PA, Survana SK, Brotherston TM. The surface anatomy of the germinal matrix of the nail bed in the finger. *J Hand Surg (British and European Volume)* 1999; 24B(5):531-533.
29. Bachi, CE, Gown AM. Detection of cell proliferation in tissue sections. *Brazilian J Med Biol Res* 1993; 26:677-687.
30. Van Erp PEJ, De Mare et al. A sequential double immunoenzymatic staining procedure to obtain cell kinetic information in normal and hyperproliferative epidermis. *Histochem J* 1989; 21:343-370.
31. Guillaud P, Vermont J, Seigneurin D. Automatic classification of cells in cell cycle phases based on Ki-67 antigen quantification by fluorescence microscopy. *Cell Prolif*, 1991; 24:481-491.
32. Siegel S, Castellan Jr NJ. *Nonparametric statistics*. Second Ed. McGraw-Hill, 1988, 399 p.
33. Hollander M, Wolfe DA. *Nonparametric statistical Methods*. John Wiley 7 sons, New York, 1973, 503 p.
34. Mogensen P. Ingrowing toenail. *Acta Orthop. Scandinav* 1971; 42:94-101.
35. Ackerman AB. *Histologic diagnosis of inflammatory skin diseases*. Williams & Wilkins, 2 ed., Baltimore, 1997.