

Treball Final de Grau

MÈTODES PER A
L'ESTUDI
HISTOPATOLÒGIC DE LA
UNITAT UNGUIAL

Methods for the histopathological study of the nail unit



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Marta Rodrigo Escanilla

Curs 2021/2022

Codi assignatura: 360416

Tutora: Dra. Mireia Martín-Satué

ÍNDEX

Índex figures i taules

Resum	1
1. Introducció	3
1.1. Unitat unguial	3
1.1.1. Estructura anatòmica de la unitat unguial.....	3
1.1.2. Estructura histològica de la unitat unguial.....	4
1.2. Obtenció i processament de mostres per a l'estudi histològic.....	5
1.3. Tècniques de tinció	7
1.3.1. Tinció H/E.....	7
1.3.2. Immunomarcatge	8
2. Objectius	8
3. Materials i mètodes	8
4. Resultats	9
5. Discussió	20
5.1. Limitacions de l'estudi.....	22
5.2. Futures línies d'investigació	22
6. Conclusions	23
7. Bibliografia	24
8. Agraïments	26
9. Annex	
9.1. Annex 1.....	27

ÍNDIX FIGURES I TAULES

Figura 1. Morfologia unitat unguial visió lateral (A) i frontal (B)	3
Figura 2. Tall histològic 20x de la unitat unguial amb tinció hematoxilina-eosina.....	4
Figura 3. Estació d'inclusió.....	6
Figura 4. Casset d'inclusió buit (A), motlles (B), bloc de parafina líquida amb motlle (C) i bloc de parafina amb el teixit (D).....	6
Figura 5. Bany de flotació.....	6
Figura 6. Micròtom de rotació.....	6
Figura 7. Tall histològic al portaobjectes.....	7
Figura 8. Tall histològic de la figura 7, tenyit amb H/E.....	7
Figura 9. Diagrama de flux que mostra el procés de selecció d'estudis.....	10
Figura 10. Microfotografia obtinguda al microscòpi òptic d'una secció histològica de pell de dit on s'ha realitzat la IHQ amb anti-SMA amb un tractament previ amb KOH. Control negatiu 20x (A), control positiu anti-SMA KOH al 0% 20x (B), 2% KOH 1 minut 20x (C), 2% KOH 2 minuts 20x (D) i 2% KOH 5 minuts 20x (E).....	18
Figura 11. Microfotografia obtinguda al microscòpi òptic d'una secció histològica de pell de dit on s'ha realitzat la IHQ amb anti-SMA amb un tractament previ amb KOH. 20% KOH 1 minut 20x (A), 20% KOH 2 minuts 20x (B) i 20% KOH 5 minuts 20x (C).....	19
Taula 1. Resultats dels articles extrets de les bases de dades.....	11
Taula 2. Resultats del llibre " <i>Scher and Daniel's Nails</i> "	15
Taula 3. Resultats dels protocols.....	16
Taula 4. Intensitat del marcatge amb anti-SMA i KOH a diferents temps (10 segons, 30 segons, 1 minut, 2 minuts i 5 minuts) i concentracions (0%, 2% i 30%) de KOH.....	17

ÍNDIX FIGURES ANNEX

Figura 1. Microfotografia obtinguda al microscòpi òptic d'una secció histològica de pell de dit on s'ha tenyit amb H/E amb un tractament previ amb KOH. KOH 2% 10 segons 10x (A) i 20% KOH 5 minuts 20x (B).....	29
Figura 2. Esquema del protocol de tinció amb H/E.....	30

RESUM

Les propietats físiques de l'ungla comporten la necessitat d'una estratègia metodològica apropiada per al seu estudi histològic. S'utilitza un ampli ventall d'opcions metodològiques amb les que cal processar-la per a ser estudiada. La falta d'un procediment estandarditzat efectiu convida a reflexionar sobre quina d'elles és l'opció més encertada.

Els objectius d'aquest treball han estat analitzar l'estat actual de la metodologia emprada per a l'estudi histopatològic de les ungles i avaluar, en la pràctica, les conseqüències sobre els teixits d'alguns dels principals tractaments.

Es realitza una cerca bibliogràfica a les bases de dades *PubMed* i *Scopus*, així com al Cercabib. Donat el caire tècnic, s'inclouen llibres d'Anatomia Patològica (AP) i protocols. D'aquesta part es pot concloure que d'entre els agents suavitzants més utilitzats, destaca l'hidròxid de potassi (KOH) amb concentracions entre el 10 i 30%. D'altres compostos són *Mollifex Gurr*, solució NAIR™, crema depilatòria *Veet* i suavitzant de la roba *Comfort*.

Pel segon objectiu, s'ha dut a terme un procediment experimental per valorar com influeix el tractament amb KOH, sobre el resultat de la immunohistoquímica (IHQ). S'han tractat seccions histològiques de pell amb KOH (0, 2 i 20%) a diferents temps, per després realitzar la IHQ amb l'anticòs contra l'actina de múscul llis [*anti-SMA (anti-smooth muscle actin)*]. Curiosament, la màxima intensitat de marcatge es va obtenir amb KOH al 2% durant 2 minuts. Es pot concloure, doncs, que aquest tractament no representa un impediment per a la IHQ.

Convé millorar la metodologia per a l'estudi histopatològic de l'ungla i optimitzar protocols.

Paraules clau: unitat unguial, agent suavitzant, hidròxid de potassi, protocol

Abreviatures: Anatomia Patològica (AP), immunohistoquímica (IHQ) i *anti-smooth muscle actin (anti-SMA)*

ABSTRACT

The physical properties of the nail involve an appropriate methodological strategy for the histological study. A wide range of methodological options are used to process the nails for being studied. The lack of an effective standardized procedure invites you to think about which one is the best option.

The aim of this project is to analyze the current state of the methodology used for the histopathological study of the nails and to evaluate, in practice, the consequences on the tissues of some of these treatments.

A bibliographic research has been performed in the PubMed and Scopus databases, as well as in the Cercabib. Books and technical protocols on Pathological Anatomy (AP) have also been included. The first conclusion is that potassium hydroxide (KOH) is among the most used softening agents used at a concentrations ranging between 10 and 30%. Other compounds are Mollifex Gurr, NAIR™ solution, Veet depilatory cream and Comfort fabric softener.

For the second objective, an experimental procedure has been performed to assess how KOH influences on the outcome of immunohistochemistry (IHQ). Histological sections of skin have been treated with KOH (0, 2 and 20%) over different time periods, and then IHQ has been performed with the antibody against the smooth muscle's actin [anti-SMA (anti-smooth muscle actin)]. Curiously, the maximum label intensity was obtained with 2% KOH over 2 minutes. It can therefore be concluded that this treatment does not in itself constitute an impediment to the IHQ.

The methodology for the histopathological study of the nail should be improved and the protocols should be optimized.

Keywords: nail unit, softening agent, potassium hydroxide, protocol

Abbreviations: Pathological Anatomy (AP), immunohistochemistry (IHQ), anti-smooth muscle actin (anti-SMA)

1. INTRODUCCIÓ

Aquest treball s'ha realitzat en el marc teòric de l'assignatura de Treball Final de Grau. El treball ha sorgit motivat per la rellevància de l'estudi de la unitat unguial i les dificultats tècniques que suposa l'estudi histopatològic de les ungles degut a les seves propietats físiques.

1.1. Unitat unguial

1.1.1. Estructura anatòmica de la unitat unguial

Les ungles són estructures formades per queratina que es localitzen cobrint l'àrea dorsal distal dels dits dels peus i de les mans. La seva principal funció és protegir, afavorir l'adherència i la manipulació fina^[1].

En algunes patologies les ungles es veuen afectades. Aquestes afeccions poden tenir un origen sistèmic, metabòlic o genètic. Una anamnesi adequada i l'exploració física minuciosa facilitaràn el correcte diagnòstic. Tanmateix, en un procés inflamatori, tumoral o infecciós també podem trobar afectada la làmina unguial. És aquí on l'estudi histopatològic serà necessari pel diagnòstic^[1].

L'aparell o unitat unguial (**figura 1**) el formen quatre elements^[1]:

1. La làmina unguial, també coneguda com a unglà.
2. La matriu, que és la responsable de produir la làmina unguial. La lúnula està situada a la zona més distal d'aquesta matriu.
3. Els plecs unguials proximals, distals i laterals de l'ungla: a la zona més distal està localitzat l'hiponiqui, que fixa la làmina unguial a la zona anterior i li proporciona protecció. Proximalment, hi ha l'eponiqui, també conegut com a cutícula.
4. El sistema de suport de la làmina unguial, constituït pel llit unguial, el teixit connectiu, la falange i els propis lligaments.

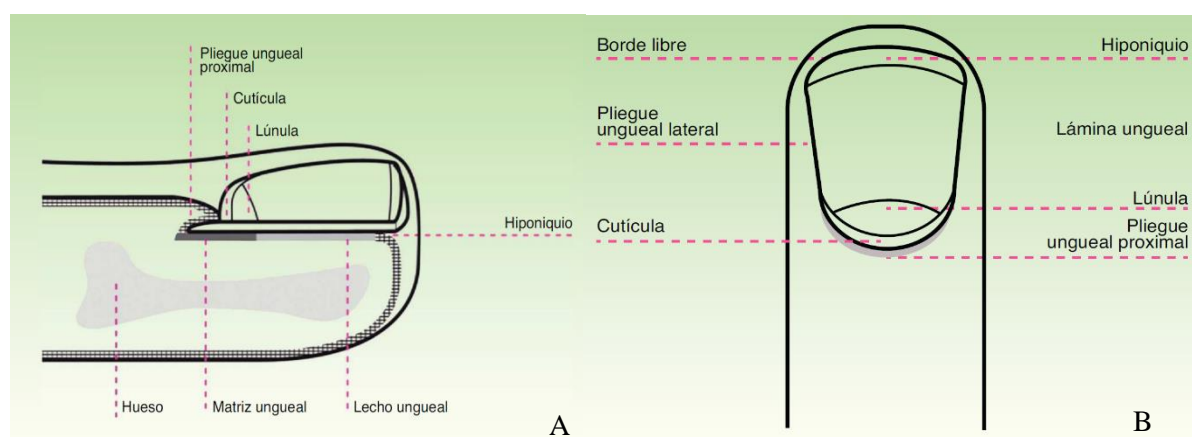


Figura 1. Morfologia unitat unguial visió lateral (A) i frontal (B) on s'indiquen els noms de les diferents estructures. Font: Martin, B. *Histopatología de la uña. Actas dermo-sifiliográficas* 104.7 (2011): 564–578. ^[1]

1.1.2. Estructura histològica de la unitat unguial

Histològicament, l'epiteli dels plecs unguials és com el de la pell, però està mancat d'unitats pilosebàcies. Es reconeix fàcilment la làmina unguial donat que està formada, únicament, per cèl·lules mortes cornificades que es tenyeixen amb l'eosina de color rosa pàl·lid^[1], tal com s'observa a la **figura 2**.

El llit unguial, que es troba per sota de la làmina unguial, està format per un epiteli fi (dues o tres capes de gruix), sense estrat granulós en estat fisiològic i amb unes poques capes de cèl·lules paraqueratòsiques en el seu pol superior, que es troben fortament adherides a la làmina unguial. Aquest epiteli té un patró de crestes epidèrmiques més aplanat que el de la resta de l'epidermis. Per sota, hi ha teixit connectiu, periosti i os.

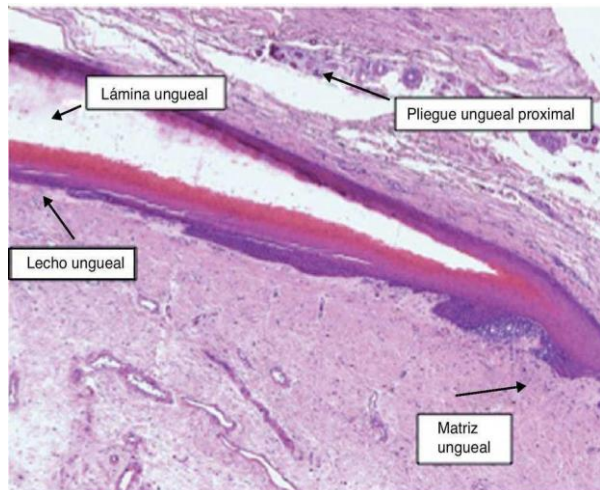


Figura 2. Tall histològic 20x de la unitat unguial amb tinció H/E. Font: Martín, B. *Histopatología de la uña. Actas dermo-sifiliográficas* 104.7 (2011): 564–578.^[1]

A la base de la matriu es troba un epiteli germinatiu, sense capa granulosa^[1].

Les crestes de l'epiteli de la matriu estan orientades obliquament en direcció proximal i dirigides cap endarrere. Aquesta orientació facilita el creixement de la làmina unguial cap a fora, en angle, i no en vertical cap a dalt. L'epiteli de la matriu es queratinitza a través d'un procés anomenat onicoqueratinització, produint la queratina dura que dona lloc a l'ungla. A la part més proximal de la matriu està la zona queratògena encarregada de produir la làmina unguial més superficial. Aquesta zona pot reconèixer-se en les seccions histològiques en estar formada per cèl·lules aplanades amb citoplasma rosa brillant. La resta de la làmina unguial es produeix a partir de la matriu distal. Es considera que el llit unguial també contribueix, d'una manera modesta, a la producció de la làmina unguial^[1].

La matriu i, en molta menor mesura, el llit unguial són les úniques porcions de l'aparell unguial que, en condicions fisiològiques, contenen melanòcits. Són cèl·lules grans, amb nombroses prolongacions, que es localitzen en les tres o quatre capes més inferiors de l'epiteli (5-6 mm), essent més nombrosos en la zona distal de la matriu. Només la meitat dels melanòcits de la matriu produeixen melanina i els que es troben al llit unguial no són actius en condicions normals. A vegades, es pot trobar melanina en talls histològics de la làmina unguial degut a la transferència de melanosomes des dels melanòcits de la matriu, sobretot en situacions d'hiperactivitat o proliferació d'aquests^[1].

1.2. Obtenció i processament de mostres per a l'estudi histològic

La tècnica histològica inclou diferents procediments als que se sotmet un teixit per tal d'obtenir una preparació histològica òptima i garantir, així, el correcte estudi i eventual diagnòstic.

Als laboratoris d'Anatomia Patològica (AP), on es processen centenars de mostres biològiques diàriament, aquest procediment està força automatitzat. El procediment engloba^[2]:

- a) **Obtenció de la mostra.** El teixit pot tenir diversos orígens: biòpsia, necròpsia, o pot tractar-se d'una part d'una peça quirúrgica. S'obté, doncs, un fragment de dimensions variables (d'entre pocs mm³ a algun cm³) de teixit representatiu del que es vol estudiar al microscopi.
- b) **Fixació.** Habitualment és química i es duu a terme submergint el fragment de teixit en un líquid fixador. L'agent fixador més utilitzat per microscòpia òptica és el formaldehid al 4%. Aquest procés evita la degradació del teixit, mantenint la morfologia i la majoria de les propietats bioquímiques i moleculars del teixit. També l'endureix, facilitant la seva posterior manipulació.
- c) **Preparació de blocs de parafina. Aquesta etapa inclou:**
 - c.1) **Deshidratació de la mostra**, ja que la parafina no és soluble en aigua; es fa de forma progressiva, submergint la mostra en concentracions creixents d'alcohol etílic (començant al 50% i seguint 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, fins arribar a l'absolut).
 - c.2.) **Aclariment de la mostra**, que té per objectiu reemplaçar l'alcohol etílic per un líquid miscible amb el medi d'inclusió, la parafina. Habitualment s'utilitza xilè. Aquest procés causa una pèrdua de color de la mostra i d'aquí el nom.
 - c.3.) **Inclusió de la mostra**, s'afegeix parafina líquida per aconseguir el bloc un cop aquesta se solidifica. Es col·loca la mostra en un motlle adequat a la mida del teixit i s'afegeix parafina líquida a 53 °C^[3]. Es deixa refredar el bloc (es pot fer sobre una placa congeladora) fins que la parafina queda sòlida. La **figura 3** correspon a l'estació d'inclusió del laboratori d'AP de l'Hospital Universitari de Bellvitge (HUB). A la **figura 4** es mostra un exemple dels motlles utilitzats i dels blocs resultants d'aquest procés d'inclusió.



Figura 3. Estació d'inclusió. S'indica el dispensador de parafina (dreta) i la placa congeladora (esquerra). Font: autoria pròpia

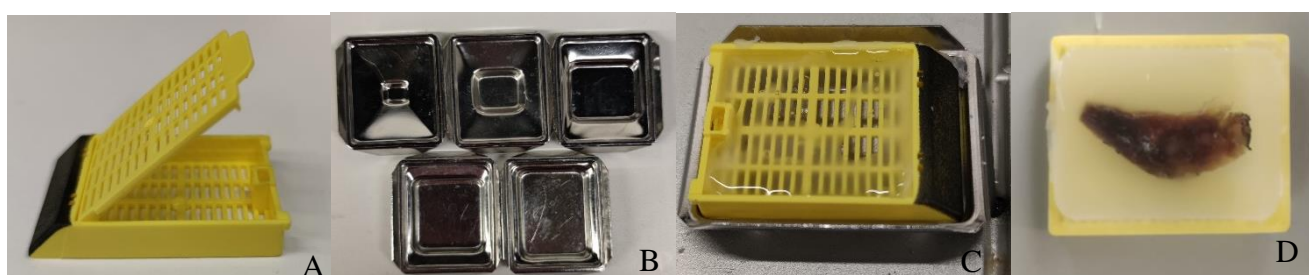


Figura 4. Casset d'inclusió buit (A), motlles (B), bloc de parafina líquida amb motlle (C) i bloc de parafina amb el teixit inclòs (D). Font: autoria pròpia

d) Microtomia; utilitzant un micròtom s'obtenen seccions habitualment entre 3 i 10 μm de gruix, que es col·loquen en un bany a 48-50 $^{\circ}\text{C}$ i, amb portaobjectes, es recullen els talls. Les figures 5, 6 i 7, obtingudes al Servei d'AP de l'HUB, il·lustren algunes d'aquestes etapes. Un cop es disposa dels talls en els portaobjectes, es procedeix a tenyir-los (o a sotmetre'ls a d'altres tècniques, com l'immunomarcatge).



Figura 5. Bany de flotació. Font: autoria pròpia



Figura 6. Micròtom de rotació. Font: autoria pròpia

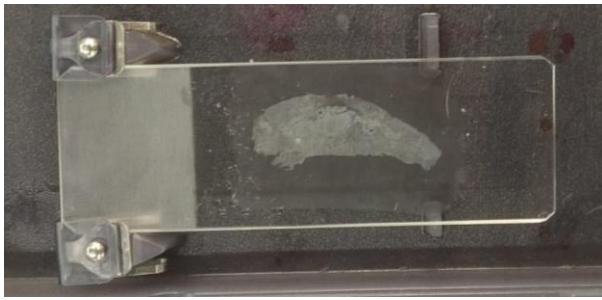


Figura 7. Tall histològic al portaobjectes. Font: autoria pròpia

- e) **Tinció i muntatge**; el primer pas és el desparafinat de la mostra. Es duu a terme el procés invers que explicat abans; s'elimina la parafina amb xilè i es rehidrata la mostra en una bateria d'alcohol etílic en concentracions decreixents fins a arribar a una solució d'aigua.

Llavors la mostra ja es pot tenyir amb la combinació de colorants escollida (**figura 8**). El més habitual és l'ús de la tinció panoràmica hematoxilina-eosina (H/E) que combina dos colorants: l'hematoxilina (colorant bàsic) i l'eosina (colorant àcid). El protocol d'aquesta tinció es detalla més endavant.

Per preservar el tall ja tenyit es fa un nou procés de deshidratació de la mostra, s'afegeix un medi de muntatge i un cobreobjectes. La **figura 8** mostra un tall histològic tenyit amb H/E i muntat, preparat per a ser observat al microscopi òptic.

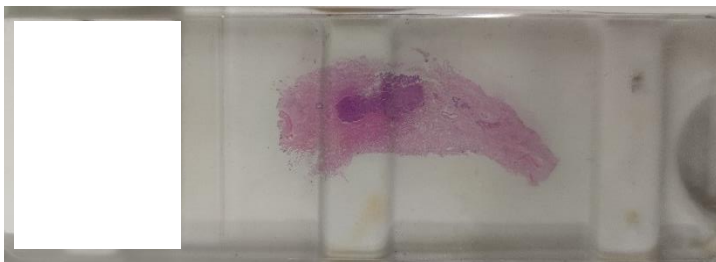


Figura 8. Tall histològic de la figura 7, tenyit amb H/E. Font: autoria pròpia

1.3. Tècniques de tinció

1.3.1. Tinció H/E

És la tècnica més habitual de tinció i es realitza en dues etapes. Per la primera s'utilitza l'hematoxilina, un colorant bàsic amb afinitat per les estructures àcides com els àcids nucleics presents als nuclis cel·lulars. En la segona etapa s'empra l'eosina, un colorant àcid amb afinitat per les estructures bàsiques, com les proteïnes. El nucli cel·lular adquireix, doncs, color lilós (o blavós) per l'hematoxilina, mentre que el citoplasma de la cèl·lula sol quedar tenyit de color rosa per l'eosina^[2]. Els detalls del protocol de tinció s'inclouen a l'**annex 1**.

1.3.2. Immunomarcatge

Es basa en l'ús d'anticossos que reconeixen i s'uneixen a un antigen específic, generalment una proteïna i que té per objectiu detectar-la i fer-la visible, posant-la de manifest mitjançant una reacció histoquímica, que genera color (immunohistoquímica (IHQ)), o a través de l'ús de fluorescència (immunofluorescència) [2].

2. OBJECTIUS

1. Analitzar l'actual estat de la qüestió pel que fa a la metodologia emprada per a l'estudi histopatològic de les ungles.
2. Avaluat, en la pràctica, les conseqüències que té sobre els teixits algun dels principals tractaments utilitzats.

3. MATERIALS I MÈTODES

Per l'objectiu 1, s'ha dut a terme una revisió panoràmica o *scoping review*. Es va realitzar una cerca bibliogràfica de la literatura en les bases de dades *PubMed* i *Scopus*. També es va utilitzar el *Cercabib* de la Universitat de Barcelona (UB) que permet l'accés a un important nombre de recursos científics i llibres de text.

Les paraules clau usades per la recerca d'articles van ser "*nail histopathology*" i "*nail biopsy*". Es van revisar els textos tenint en compte els següents criteris d'inclusió i exclusió dels treballs:

- Criteris d'inclusió:
 - Basats, o que apliquen, tècniques d'estudi histopatològic unguial
 - Text complet accessible, articles, llibres i/o capítols de llibres
 - Idioma castellà o anglès
- Criteris d'exclusió:
 - Títols no rellevants
 - No inclouen referències a les tècniques utilitzades
 - Articles anteriors a l'any 2000

Degut al caire tècnic de la revisió, s'han inclòs llibres d'AP i protocols redactats per especialistes, dermatòlegs i patòlegs.

En una segona cerca a les mateixes bases de dades, els termes "*nail biopsy*" havien d'estar inclosos en el títol. Els criteris d'inclusió i d'exclusió van ser els mateixos.

Per l'objectiu 2, s'ha dut a terme un estudi pràctic al laboratori per veure l'impacte que té el tractament amb KOH a les preparacions histològiques. El detall dels protocols emprats s'inclou a l'annex. Els talls histològics estudiats són de pell humana i s'han obtingut en el context d'un acord de cessió de mostres entre el Servei d'AP de l' HUB i la Unitat d'Histologia de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, amb finalitat acadèmica.

4. RESULTATS

Per a l'objectiu 1, es va decidir dur a terme una revisió panoràmica (*scoping review*) per tal d'identificar llacunes i resumir els resultats d'aquesta àrea concreta de coneixement. Vàrem considerar que era una bona primera aproximació al tema, ja que no existeixen d'altres revisions de l'estil sobre aquest tema. Aquest tipus de revisió pot ser, doncs, el punt de partida de revisions més extenses i de noves oportunitats d'investigació^[4].

Seguint els criteris indicats als Materials i Mètodes, es va dur a terme la tria de treballs. El resum està indicat com a diagrama de flux (**figura 9**). En resum, al *Cercabib* es van obtenir un total de 93 resultats, dels quals, finalment, vaig seleccionar-ne 5. A *PubMed* dels 31 articles inicials, vaig utilitzar-ne 2 i a *Scopus* dels 74, 3.

Les principals troballes es presenten a manera de taula. La **taula 1**, recull les dades extretes dels articles científics seleccionats, la **taula 2** resumeix la metodologia recollida al llibre *Scher and Daniel's Nails* i la **taula 3**, recull els 2 protocols facilitats pels serveis d'AP.

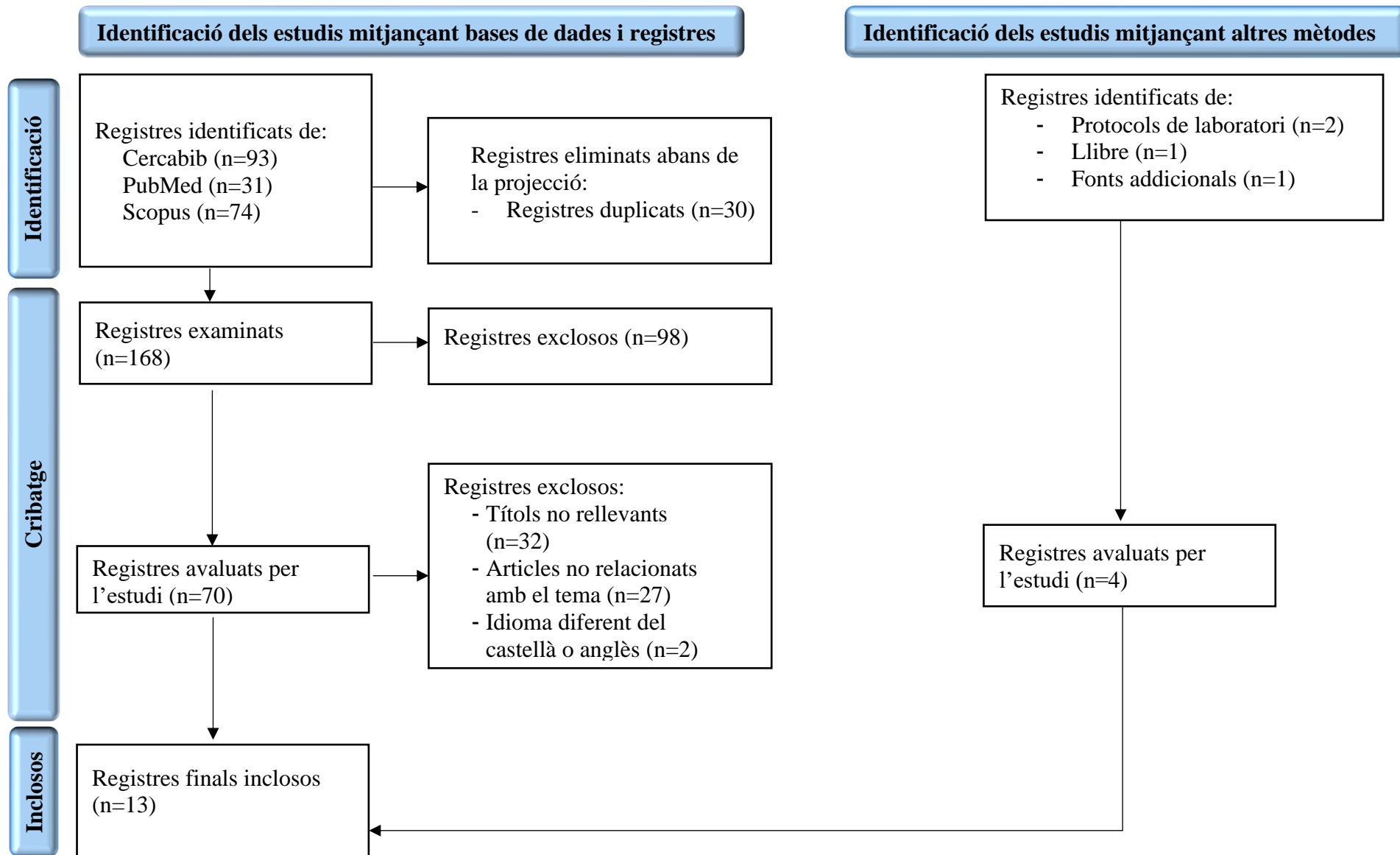


Figura 9. Diagrama de flux que mostra el procés de selecció d'estudis

AUTOR/ ANY	TIPUS D'ESTUDI	OBJECTIU	PATOLOGIA	TÈCNICA	LIMITACIONS	RESULTATS	OBSERVACIONS
Grover et al. ^[5] (2003)	32 pacients d'ambdós sexes que presentaven taconíquia	Avaluar els aspectes clínics i histopatològics de la taconíquia i la utilitat de la biòpsia longitudinal de les ungles	Taconíquia	A 21 dels pacients se'ls hi va realitzar un <i>punch</i> de 4 mm. La mostra es va tenir tota la nit en formaldehid al 10%. Posteriorment en fenol al 3% durant cinc dies. Es tallen seccions a 5 µm i es tenyeixen amb H/E i PAS (àcid periòdic de Schiff)	Una biòpsia no es va poder analitzar, ja que el teixit era bastant fràgil i es fragmentava en tallar-lo		
Grover et al. ^[6] (2005)	270 pacients d'ambdós sexes amb patologia unguial. A 65 se'ls hi va realitzar una biòpsia, ja que les proves rutinàries no van ser concloents	Avaluar el procediment de la biòpsia unguial en pacients amb distròfies unguials infeccioses i no infeccioses per correlacionar les característiques clíniques i histològiques	Onicomicosi (ONM), melanoníquia longitudinal, taconíquia, psoriasi, liquen pla, melanomes i tumor glòmic	3% de fenol i les seccions van ser tallades a 5 µm. Es van tenyir amb H/E i PAS		Un 70.3% patia una patologia infecciosa, la més comuna ONM (51.8%), mentre que la patologia no infecciosa més prevalent va ser la traconíquia (9.2%)	La biòpsia no només aporta informació etiològica, diagnòstica i pronòstica, sinó que també ajuda a conèixer la patogènia. És necessari que tant els dermatòlegs com els patòlegs tinguin un ampli coneixement de l'anatomia unguial i el processament d'aquesta

Taula 1. Resultats dels articles extrets de les bases de dades

Grover et al. ^[7] (2012)	Utilitat pràctica de la biòpsia unguial en la pràctica dermatològica	Descriure l'anatomia unguial emprant la biòpsia i identificar quines patologies la requereixen	ONM, taconíquia, psoriasi unguial, líquen pla, tumors o malalties sistèmiques			La biòpsia no està indicada per totes les patologies de la unitat unguial. Malgrat això, quan ho està, sol ser l'única eina pel diagnòstic	La biòpsia és una tècnica útil per obtenir un diagnòstic d'una patologia unguial clínicament ambigua que no és diagnosticable per la història, aparença clínica i micologia de rutina
Martínez et al. ^[8] (2014)		Revisar tècniques de lesions de pell i ungles per elaborar una guia	Qualsevol patologia de la unitat unguial	Mostra orientada. Fixació amb formaldehid al 10% en hidròxid de potassi (KOH) al 20%, <i>Tween</i> TM 40 al 10% o àcid nítric al 10%. Tinció amb H/E, PAS i plata de metanamina. Opcionalment S100 i HMB45			És necessari el coneixement de l'anatomia i fisiologia de la unitat unguial, igual que l'obtenció de la biòpsia i les indicacions de la tècnica d'obtenció
Grover et al. ^[9] (2018)		Recopilar els procediments per a la biòpsia unguial i resumir l'evidència de la literatura	Onicodistròfia unguial aïllada, ONM, melanoníquia longitudinal, psoriasi, líquen pla i melanomes	Mostra orientada. Fixar en formaldehid al 10% durant 24 h. 3 agents suavitzants [<i>Mollifex Gurr</i> , KOH 10% i tioglicolat de potassi 10% (NAIR TM)]. S'obtenen seccions i es tenyeixen amb H/E, PAS o plata de metenamina de Gomori			

Taula 1. Resultats dels articles extrets de les bases de dades

Velásquez et al. ^[10] (2019)	66 pacients amb sospita d'ONM	Valorar l'eficàcia de la biòpsia unguial en el diagnòstic d'ONM	ONM	Agar granulat a 1.5 g/100 ml en una solució de formaldehid al 10%	Baixa mostra	El KOH té una major freqüència de positius respecte a la biòpsia unguial	La biòpsia permet discriminar entre la colonització i invasió i confirmar l'agent etiològic
Doolan et al. ^[11] (2019)		Avaluar l'eficàcia d'introduir el teixit dins d'un <i>casset</i> orientat i ben identificat		Es marca l'extrem proximal amb tinta per conservar l'orientació. Submergim el teixit en formaldehid al 10%. Les mostres que contenen ungla, s'estoven en solució NAIR™ poques hores fins a 2-3 dies. Posteriorment, el teixit és processat en alcohol al 70% seguit del protocol de cada laboratori		L'ús d'aquesta tècnica ajuda a obtenir una biòpsia adequada pel seu estudi	És un procediment diagnòstic segur i útil per molts trastorns unguials quan els mètodes clínics i de laboratori rutinaris no són suficients per al diagnòstic
Sharma et al. ^[12] (2020)	Estudi descriptiu transversal consecutiu des de desembre de 2013 a abril de 2015 en pacients d'entre 15 i 63 anys. Es van obtenir 30 biòpsies amb	Avaluar i comparar el paper de diferents agents suavitzants en biòpsies d'ungles amb patologies inflamàtores	Malaltia unguial inflamatòria	Fixar durant 24 h amb formaldehid al 10%. Es van processar durant 14 h amb alcohol isopropílic graduat, acetona, xilè i parafina. Es retalla el bloc de parafina i es col·loca boca avall en una placa de Petri que conté l'agent suavitzant (suavitzant de la roba <i>Comfort</i> , crema depilatòria <i>Veet</i> , aigua destil·lada i KOH al 30%) durant 10		El suavitzant <i>Comfort</i> i la crema <i>Veet</i> són suavitzants efectius per la queratina, però la crema depilatòria en ser més viscosa, pot no ser un bon mètode per obtenir una bona tira de seccions. El KOH va produir un estovament	

Taula 1. Resultats dels articles extrets de les bases de dades

	<i>punch</i> de 4 mm			minuts. Es tallen les seccions (4 µm) del teixit després de cada aplicació i, després, cada bloc es torna a retallar entre cada tractament per evitar un efecte acumulatiu dels diferents agents. Es tenyeixen amb H/E		desproporcionat i un efecte perjudicial en la qualitat de la secció. Si pot ser útil per unghes molt hiperqueratòsiques. L'aigua destil·lada no va estovar adequadament el teixit i la qualitat de la secció va ser mediocre. Per tant, no és un agent suavitzant ideal	
Byung et al. ^[13] (2022)	21 cadàvers (27 polzes i 28 hàl·luxs)	Proporcionar mesures objectives del melanoma subunguial pel seu ús en la cirurgia funcional analitzant l'anatomia unguial	Melanoma subunguial	Procés histològic estàndard. Les seccions es van obtenir a 10 µm i tenyides amb H/E i CD31	Poca mostra, tots els cadàvers eren coreans i en gran majoria, homes		

Taula 1. Resultats dels articles extrets de les bases de dades

TÈCNICA	RESULTATS
<p>Tècnica amb oli de cedre (García)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Alcohol al 90% 25 minuts - Alcohol al 95% 25 minuts - Alcohol al 98% 25 minuts - Submergim la mostra en oli de cedre durant 72 hores a T° ambient - Algunes mostres necessiten un pas extra amb xilè per afavorir la infiltració de parafina - Parafina a 61°C durant 2-3 h <p>Tècnica NAIR™ (semblant a la crema depilatòria Veet) (Dick et al.)</p> <ul style="list-style-type: none"> - La mostra ha de mesurar 0.2 cm - S'embolica en un paper de biòpsia i s'introdueix dins el <i>casset</i>. Es submergeix en la solució Nair durant 2-3 h. Es fa en una proporció 2:1 (dos parts en la solució Nair i una en aigua) - Es deixa el casset dins d'aigua corrent i es processa dins el protocol estàndard del laboratori <p>Tècnica amb KOH al 17% (Nail Prep, StatLab) (Ruben et al)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Es diposita la mostra dins d'una solució amb amoníac al 10% entre 4 i 6 h depenent del gruix - La mostra es deixa durant 5 min en aigua corrent - Es fixa en formaldehid al 10% durant 4-6 h - Es processa dins el protocol estàndard del laboratori - S'elabora el bloc de parafina - Es submergeix en <i>NailPrep</i> durant 15-20 min - Es tallen les seccions i es deixen a l'estufa durant 1 h a 60°C - La tinció és amb H/E 	<p>L'oli de cedre provoca menys enduriment i danys a l'ungla. És ideal tant per mostres que continguin parts toves com queratòsiques.</p> <p>Actualment, l'autor utilitza KOH al 17% i amoníac domèstic al 10%. L'hidròxid de potassi pot danyar la melanina i els pigments de ferro.</p> <p>També es pot submergir el bloc 15 minuts en un bany d'aigua abans del tall.</p>

Taula 2 . Resultats del llibre “Scher and Daniel’s Nails” escrit per Rubin et al. [14]

HOSPITAL/ ANY	PROCEDIMENT	
Hospital Son Llàtzer ^[15] (2009)	Després del procés d'estovament i fixació (col·locar l'ungla en KOH durant 1 hora, comprovar duresa i si no és suficient es manté una altra hora fins a un màxim de 3 hores i posteriorment es fixa en formaldehid). Es realitzen 3 talls i es tenyeixen únicament amb PAS.	
Hospital Universitari de Bellvitge ^[16] (2020)	KONCPA (La mostra ha d'arribar en fresc, si no s'ha d'avisar al patòleg)	NO KONCPA
	Fer un procediment o un altre, dependrà del facultatiu que realitzi la petició de la biòpsia.	
	<ul style="list-style-type: none"> - S'introdueix la mostra en un tub <i>Falcon</i> - Es submergeix la mostra en 3ml de KOH al 20% previament escalfada a 56° al bany Maria 30 minuts, fins que es desfaci l'ungla - Un cop desfeta, es retira del bany i s'afegeix 7 ml de sèrum fisiològic, creant una pasta - Es centrifuga a 2500 rpm. 10 minuts - Decantem el sobrenedant - Amb una pipeta Pasteur s'agafa el sediment i es realitzen extensions en un portaobjectes pretractat - Es deixa assecar a temperatura ambient 24 hores - Es tenyeix amb PASD i Grocott <p>*Si és un <i>punch</i> de làmina unguial, el patòleg ha de separar l'ungla de la pell. El procediment és el mateix</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Es descriu la mostra - Es submergeix l'ungla en KOH al 20% - Es comprova la duresa amb una agulla histològica cada 2-3 minuts fins que la poguem tallar - Es realitzen seccions transversals - Els fragments d'ungla s'introdueixen al <i>casset</i>. Al lateral d'aquest, amb llapis s'escriu "ungla" - Els <i>cassets</i> s'introdueixen en un pot amb formaldehid, per posteriorment processar-los amb el protocol estàndard del laboratori

Taula 3. Resultats dels protocols

Donat que un dels protocols més utilitzats inclou l'ús de KOH, aquest és el que hem seleccionat per a ser estudiat a la pràctica. Segons el recull de l'experiència dels professionals, un inconvenient dels tractaments fets servir és la dificultat que es té després per obtenir resultats concloents si es vol dur a terme IHQ. Per valorar com afecta el KOH al resultat de la IHQ, hem dut a terme una IHQ amb un anticòs anti-SMA, ben caracteritzat a pell, després de tractar els talls amb 3 concentracions de KOH (0, 2 i 20%) a diferents temps (10 segons, 30 segons, 1 minut, 2 minuts i 5 minuts).

Després d'haver realitzat el protocol detallat a l'**annex 1**, els resultats han estat analitzats per microscòpia òptica per dos observadors independents i corroborats per un tercer. Es va registrar la intensitat del marcatge segons el criteri: +, baix; ++, intermedi; +++, intens. El resum d'aquests resultats de marcatge es recull a la **taula 4**.

Cal destacar que en totes les condicions s'obtenen unes tincions correctes (**figures 10 i 11**), coincidint amb la localització d'SMA que ja està descrita. Si es compara la intensitat de marcatge, aquesta és màxima quan s'utilitza KOH al 2%.

També, s'ha dut a terme el mateix procediment amb H/E. Les imatges es poden veure a la **figura 1** de l'**annex 1**.

INTENSITAT DEL MARCATGE				
TEMPS	0% KOH (CONTROL)	2% KOH	0% KOH (CONTROL)	20% KOH
10 segons	+	++	+	++
30 segons	+	++	+	++
1 minut	+	+	+	+
2 minuts	+	+++	+	++
5 minuts	+	++	+	++

Taula 4. Intensitat del marcatge amb anti-SMA i KOH a diferents temps (10 segons, 30 segons, 1 minut, 2 minuts i 5 minuts) i concentracions (0%, 2% i 30%) de KOH

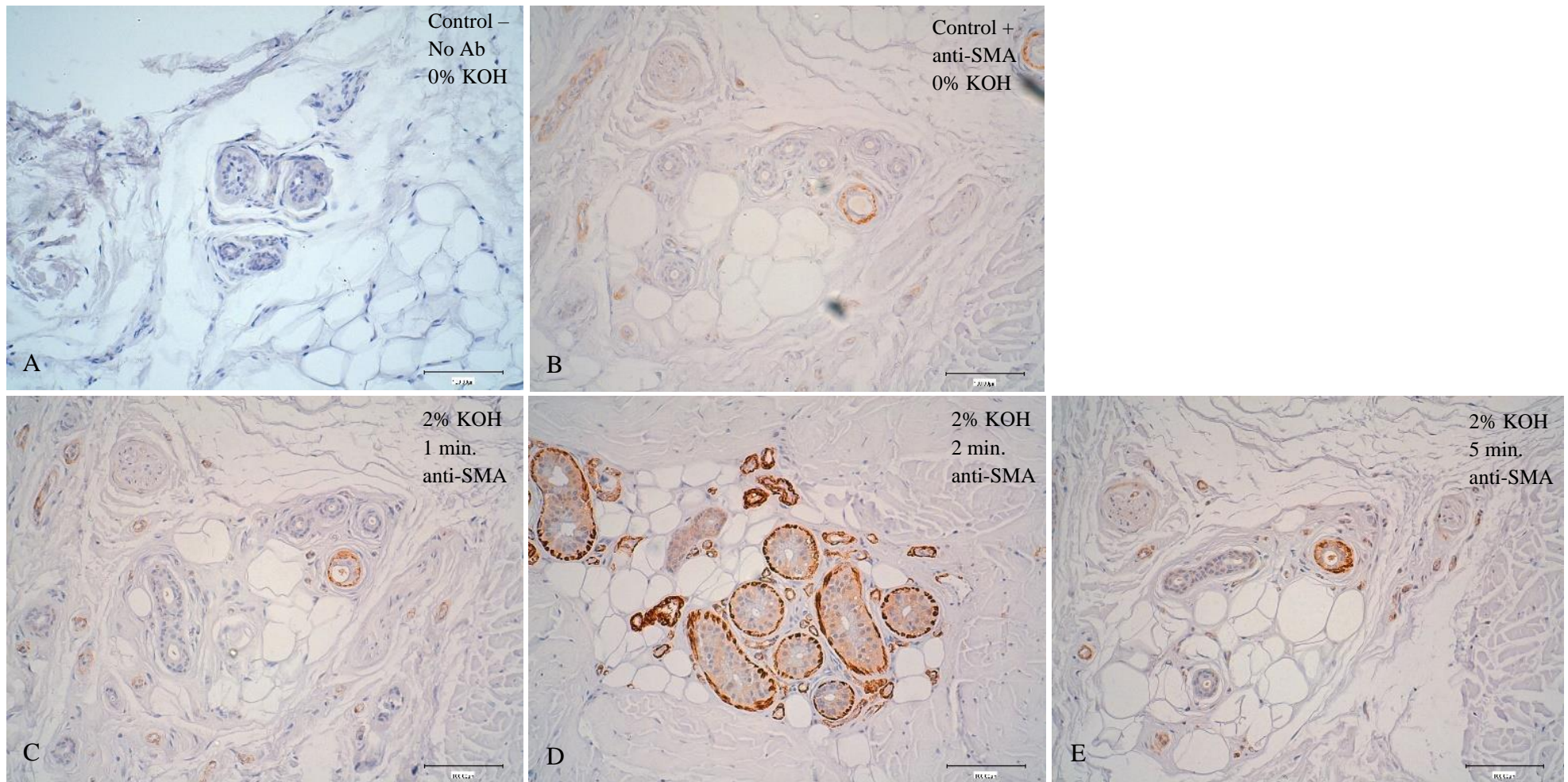


Figura 10. Microfotografia obtinguda al microscòpi òptic d'una secció histològica de pell de dit on s'ha realitzat la IHQ amb anti-SMA amb un tractament previ amb KOH. Control negatiu 20x (A), control positiu anti-SMA KOH al 0% 20x (B), 2% KOH 1 minut 20x (C), 2% KOH 2 minuts 20x (D) i 2% KOH 5 minuts 20x (E). Font: autoria pròpia

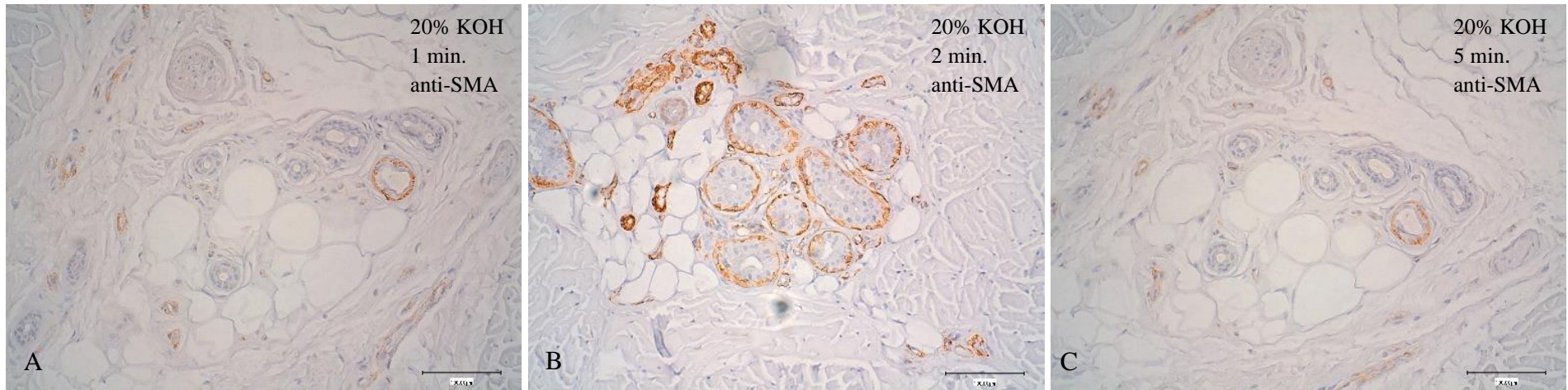


Figura 11. Microfotografia obtinguda al microscòpi òptic d'una secció histològica de pell de dit on s'ha realitzat la IHQ amb anti-SMA amb un tractament previ amb KOH. 20% KOH 1 minut 20x (A), 20% KOH 2 minuts 20x (B) i 20% KOH 5 minuts 20x (C). Font: autoria pròpia

5. DISCUSSIÓ

En aquest apartat s'exposa l'anàlisi dels resultats obtinguts pel que fa a la cerca d'informació sobre la metodologia emprada per a l'estudi histopatològic de les ungles (objectiu 1) i la pràctica duta a terme per avaluar les conseqüències de l'ús d'un dels tractaments més habituals, el KOH, en la IHQ (objectiu 2).

Després d'analitzar les diferents fonts d'informació incloses en l'estudi (articles, llibres i protocols), cal destacar dos aspectes metodològics en què els autors coincideixen, podent-se considerar el *gold standard*: l'ús de formaldehid al 10% com a fixador, i la tinció amb H/E. Excepte Sharma *et al.*^[12] tots tenen en comú, també, l'ús de PAS com a tècnica de tinció complementària amb la finalitat d'observar microorganismes. Martínez *et al.*^[8] i Grover *et al.*^[9] inclouen una tercera tècnica, amb plata de metenamina per a la detecció de fongs.

Les principals diferències fan referència a l'ús dels estovants. Grover *et al.* i Sharma *et al.* són els autors que més varietat n'han aplicat en els seus estudis. Els seus protocols coincideixen força en l'ús d'aquests agents. Grover *et al.*^[5,6] van realitzar els primers estudis amb fenol al 3%; posteriorment van utilitzar KOH al 10% i solució NAIR™ (tioglicolat al 10%). Curiosament, tant Grover *et al.*^[9] com Sharma *et al.*^[12] han provat suavitzant de roba (*Mollifex Gurr* i *Comfort*, respectivament). Sharma *et al.*^[12] també han utilitzat crema depilatòria *Veet* (un dels seus components és el tioglicolat), aigua destil·lada i KOH al 30%. Martínez *et al.*^[8] coincideixen amb els anteriors autors en l'ús de KOH, tot i que en proporcions diferents (al 10%) i afegeixen *Tween*™40 al 10% i àcid nítric al 10%. Doolan *et al.*^[11] i Velásquez *et al.*^[10] fan servir un únic estovant: solució NAIR™ i agar granulats 1.5 g/100 ml, respectivament. Byung *et al.*^[13] són els únics autors que processen les biòpsies unguials com la resta de mostres. Només Grover *et al.*^[5,6], Sharma *et al.*^[12] i Byung *et al.*^[13] especifiquen el gruix de la secció que obtenen per microtomia: 5 µm, 10 µm i 4 µm, respectivament. Tot i no coincidir, es troben dins del rang habitual de gruix de secció histològica.

Els únics autors que estableixen unes conclusions sobre l'ús dels diferents productes en el seu estudi són Sharma *et al.*^[12] determinen que tant el suavitzant de roba *Comfort* com la crema depilatòria *Veet* són efectius com estovants de la queratina, tot i que aquesta última és molt viscosa i pot dificultar la microtomia. També conclouen que el KOH al 30% dona lloc a un estovament desproporcionat, resultant efectiu només en ungles hiperqueratòsiques. En últim lloc, l'aigua destil·lada no estava adequadament el teixit i la secció obtinguda resulta d'una qualitat mediocre.

Rubin *et al.*^[14] recullen al seu llibre *Scher and Daniel's Nails* la proposta de tres autors diferents respecte al tema que tractem. Mentre que Dick *et al.*^[14] utilitzen NAIR coincidint amb Grover *et al.*^[9] i Doolan *et al.*^[11], Ruben *et al.*^[14] es decanta per l'ús de KOH al 17% igual que Martínez *et al.*^[8] i Sharma *et al.*^[12], però en concentracions diferents, tal i com queda reflectit anteriorment.

Els estudis de Michael García^[14] també els recull el llibre de Rubin. García introdueix l'ús d'oli de cedre com a tractament, i es conclou que és l'agent suavitzant que provoca més estovament, menys danys a l'ungla i és ideal tant per mostres que continguin parts toves com queratòsiques. Tot i això, Rubin *et al.*^[14] usen actualment *Nail Prep* (KOH al 17% i amoníac domèstic al 10%). Queda palès que no hi ha un únic procediment seguit pels autors recollits aquí, tot i que hi ha coincidències en l'ús prioritari de KOH com a agent suavitzant, tot i usar-se a concentracions diferents, que varien entre 10% i 30%. Aquesta diversitat es manifesta, així mateix, als protocols d'estovament de l'ungla que segueixen al Servei d'AP de l'HUB^[16] (L'Hospitalet de Llobregat) i l'Hospital Son Llàtzer^[15] (Palma de Mallorca). Aquest últim, segueix un protocol. Utilitzen com agent suavitzant l'hidròxid de potassi. Tot i això, Rubin *et al.*^[14] desaconsellen el seu ús perquè pot danyar la melanina i els pigments de ferro. El PAS és la seva única tècnica de tinció.

A l'HUB se segueixen dos procediments ben diferenciats: d'un en resulta l'extensió de l'ungla després d'haver-la desfet (KONCPA), i de l'altre se n'obtenen seccions d'aquesta (NO KONCPA). L'ús d'un o l'altre depèn del facultatiu que realitza la petició de la biòpsia^[16].

Els diferents estudis analitzats coincideixen en un punt important, que la biòpsia és una eina útil per assolir el diagnòstic d'una patologia unguial clínicament ambigua i que no es pot diagnosticar ni per la història ni per l'aparença clínica. L'estudi histopatològic permet discriminar entre la colonització i la invasió, confirma l'agent etiològic i patogènic i és un procediment diagnòstic segur^[6,7,8,10,11].

Resulta, doncs, imprescindible dur a terme més estudis que permetin establir un protocol per a l'adequat processament tècnic de l'aparell unguial.

Respecte a la part experimental realitzada a la Unitat d'Histologia de la UB, s'ha analitzat la IHQ amb un anticòs ja validat i usat al laboratori (anti-SMA) en talls histològics de pell humana tractats amb diferents concentracions de KOH i a diferents temps. En totes les condicions, les tincions han sortit correctament. El marcatge, però, és màxim quan el tall es preincuba amb KOH al 2% durant 2 minuts. D'altra banda, la tinció amb H/E també resulta adequada en totes les condicions, però és màxima amb el tractament de KOH al 20%.

Els resultats indiquen que la influència del KOH depenen tant de la concentració com del temps, però que en si mateix, no impedeixen dur a terme amb èxit una IHQ. Aquest és un resultat interessant, ja que se sol atribuir al KOH, les dificultats per a dur a terme amb el teixit tractat, tècniques com la IHQ. Per comprovar aquests resultats caldria repetir l'experiment en les diferents concentracions i temps.

El fet que el marcatge més intens s'obtingui als 2 minuts amb 2% KOH, per sobre del control positiu de l'experiment, sense tractament, ens ha fet pensar que aquest tractament podria estar afavorint el reconeixement anticòs-antigen. Estaria actuant d'element desemascarador d'antigen. Les mostres emprades per aquest experiment estan fixades amb formaldehid, factor que sovint provoca que els antigens siguin menys accessibles pels anticossos específics. Per revertir aquesta situació es fan procediments per desemascarar els antigens, combinant altes temperatures amb tampons a diferents pH com el citrat de sodi a pH 6 o l'EDTA a pH 8^[17].

El KOH, una base forta, podria afavorir aquest desemascarament i per això s'aconsegueix un marcatge més intens. Per això serà molt interessant continuar aquesta investigació.

5.1. Limitacions de l'estudi

La principal limitació de l'estudi és l'escassa informació sobre detalls metodològics respecte a l'estudi histopatològic de les ungles. L'absència de conclusions envers els estovants utilitzats pels diferents autors, dificulta el disseny d'una metodologia òptima. Això mateix, però, és el que ha motivat aquesta revisió panoràmica.

Pel que fa a l'objectiu 2 del treball, la limitació ha estat el temps i els recursos. Caldria repetir els experiments per corroborar els resultats, assajar més condicions, i fer-ho amb més mostres per tal de completar l'estudi. Els resultats obtinguts, però, reforcen l'interès a continuar analitzant aquests tractaments.

5.2. Futures línies d'investigació

Per millorar la qualitat de les biòpsies unguials i facilitar el treball dels professionals que es dediquen a aquest camp, cal seguir realitzant investigacions sobre els diferents tractaments, confrontar-los i mirar de consensuar un protocol aplicable segons el tipus d'ungla i la patologia a diagnosticar.

6. CONCLUSIONS

1. L'abordatge de la metodologia histopatològica unguial no mostra un patró d'actuació consensuat entre els autors. El tractament per estovar l'ungla més utilitzat és amb KOH amb concentracions entre el 10 i 30%, tot i que la més referenciada és al 20%.
2. El tractament amb KOH, en si mateix, no és un impediment per obtenir resultats de tinció H/E ni d'IHQ. El KOH pot estar exercint d'agent desemascarador d'antígens. L'optimització de protocols per a l'estudi histopatològic de l'ungla resultarà en una millora de la tasca tècnica als Serveis d'AP i del diagnòstic per part dels professionals.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Martín B. Histopatología de la uña. *Actas dermo-sifiliográficas*. 2011;104(7):564-78.
2. Flores AY. Introducción a la técnica histológica: El Cid Editor; 2009.
3. Janampa K, Cerón O, Morales O, *et al.*. Diseño y construcción de acumulador solar térmico por cambio de fase para un secador solar familiar. *Tecnia*. 2020;30(1):90-7.
4. Codina L. Scoping reviews: características, frameworks principales y uso en trabajos académicos [online].2021.[cited 2022 April 30]. Available from: <https://www.lluiscodina.com/scoping-reviews-guia/>.
5. Grover C, Khandpur S, Reddy BS, *et al.*. Longitudinal nail biopsy: utility in 20-nail dystrophy. *Dermatol Surg*. 2003;29(11):1125-9.
6. Grover C, Nanda S, Reddy BS, *et al.*. Nail biopsy: assessment of indications and outcome. *Dermatol Surg*. 2005;31(2):190-4.
7. Grover C, Chaturvedi UK, Reddy BS. Role of nail biopsy as a diagnostic tool. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2012;78(3):290-8.
8. Martínez WB, Restrepo R. Procesamiento de biopsias de piel en el laboratorio de patología. *Rev asoc colomb dermatol*. 2014; 22(1): 39-55.
9. Grover C, Bansal S. Nail Biopsy: A User's Manual. *Indian Dermatol Online J*. 2018;9(1):3-15.
10. Velásquez V, de Bedout C, Cardona JA, *et al.*. Evaluation of the usefulness of nail biopsy in the diagnosis of onychomycosis. *Rev Iberoam Micol*. 2019;36(2):72-8.
11. Doolan BJ, Prakash S, Tan CG, *et al.*. The use of cassettes for the collection of nail biopsy specimens. *Australas J Dermatol*. 2019;60(3):248-50.
12. Sharma P, Sharma S, Kaul Murthy S, *et al.*. Comparison of four softening agents used on formalin-fixed paraffin-embedded nail biopsies with inflammatory disease. *Journal of Histotechnology*. 2020;43(1):3-10.
13. Byung JK, Jinhyun K, Julong H, *et al.*. Functional Surgery for Subungual Melanoma: Surgical Tips Based on Histological Analysis of 21 Cadavers. *Dermatol Surg*. 2022;48(1):7-11.
14. Rubin AI, Jellinek NJ, Ralph Daniel C, *et al.*. Scher and Daniel's nails: Diagnosis, surgery, therapy: Fourth edition. 2018. 48-58.
15. Gómez A, García C, Serrano S. Estovament d'ungles. *Hospital Universitari de Bellvitge*;2020.

16. García M. Instrucción técnica. Prcesamiento de biopsias. Hospital Son Llàtzer;2009.
17. Hofman F. Immunohistochemistry. Curr Protoc Immunol. 2002;21:(21).
18. Megías M, Molist P, Pombal MA. Atlas de histología vegetal y animal. Técnicas histológicas. [online]. 2019. [cited 2022 March 12]. Aavailable from: <http://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/1-introduccion.php>.

8. AGRAÏMENTS

Aquest treball no hauria estat possible sense l'ajuda de la meva tutora, la Dra. Mireia Martín-Satué. Agrair-li el privilegi de poder compartir els seus coneixements a través dels seus consells i motivar-me per sempre anar més enllà. També, fer una menció especial a l'Inma Gómez de Aranda per tot el que he après amb ella i per la seva paciència. A l'Ernest Díaz, per tot el recolzament al llarg del procés i com a observador independent dels resultats histològics.

Al Dr. August Vidal i la Dra. Rosa Penín, patòlegs del Servei d'AP de l'HUB per la seva disposició a ajudar-me. A la Dolores Moreno, coordinadora del personal tècnic del servei d'AP de l'HUB per facilitar-me la informació que he necessitat.

Gràcies als meus amics. Gràcies per formar part d'aquesta etapa, sense vosaltres res hauria estat el mateix.

Gràcies a la meva família. M'heu dedicat temps, esforç i recursos de manera incondicional i ara jo us dedico aquest treball final.

9. ANNEX

9.1. Annex 1

PROTOCOL EXPERIMENTAL: TRACTAMENT AMB KOH + TINCIÓ H/E I IMMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) AMB ANTI-SMOOTH MUSCLE ACTIN (α SMA)

PART COMÚ

1. Seleccionem els talls a utilitzar. Fem servir 22 talls de parafina de 4 μ m d'una mostra de dit del peu i 22 talls de 4 μ m d'empenya (22 talls per a H/E i 22 talls per a la IHQ).
2. Posem els talls a l'estufa a 60 °C per eliminar la parafina sobrant.
3. Preparem les solucions de KOH:
2% KOH \rightarrow 1 g de KOH en 50 ml d'H₂O
20% KOH \rightarrow 10 g de KOH en 50 ml d'H₂O
4. Realitzem el desparafinat i hidratació del teixit als 44 talls
3 x 5 minuts de xilè
2 x 5 minuts d'alcohol (OH) absolut (ABS)
2 x 5 minuts d'OH 95%
2 x 5 minuts d'OH 70%
Rentat 3 x 5 minuts d'aigua destil·lada
5. Realitzem el tractament segons els temps i concentracions indicats a la taula:

KOH 2%	KOH 20%	H ₂ O (controls)
10 segons	10 segons	
30 segons	30 segons	
1 minut	1 minut	
2 minuts	2 minuts	
5 minuts	5 minuts	
10 talls	10 talls	

Immediatament després de submergir cada preparació en KOH, fem tres rentats amb aigua destil·lada per eliminar les restes de KOH i separem els talls en dues cubetes, una per l'H/E i l'altra per IHQ.

H/E (22 talls)

1. Tinció

2 minuts en hematoxilina

1 minut en aigua de l'aixeta

3 segons d'alcohol clorhídric (OH 95% + 1% àcid clorhídric)

1 minut d'aigua de l'aixeta

5 segons d'aigua amoniacal (1% amoníac en aigua)

1 minut d'aigua de l'aixeta

1 minut d'aigua destil·lada

2 minuts d'eosina

2. Deshidratem les mostres

3 x 1 minut OH 95%

1 x 1 minut OH ABS

1 x 2 minuts OH ABS

3 x 5 minuts xilè

3. Les muntem amb medi de muntatge DPX

IHQ (22 talls)

DIA 1

1. 2 rentats de 5 minuts en tampó PBS (*Phosphate Buffered Saline*)

2. 30 minuts pel bloqueig de les peroxidases endògenes [10% metanol, 2% d'aigua oxigenada (H₂O₂) en PBS]

En 120 ml de PBS:

10% metanol $\frac{x}{120} = \frac{10}{100} \rightarrow 12$ ml de metanol

2% d'aigua oxigenada $\frac{x}{120} = \frac{2}{100} \rightarrow 2,4$ ml d'aigua oxigenada

3. 3 rentats de 5 minuts per eliminar les restes del pas anterior

4. Col·locar les preparacions als carros amb *coverplates*

5. Bloqueig de les unions inespecífiques [0,2% gelatina, 0,2% tritó X-100, 20% NGS (*normal goat serum*) en PBS].

6. Afegim l'anticòs primari [*anti-smooth muscle actin* (SMA), Abcam ab5694]
Dilució 1:400 en PBS. Fem càlculs per 23 preparacions (cada preparació necessita 125 µl d'anticòs)

$$125 \times 23 = 2875 \text{ µl PBS} \rightarrow \frac{1}{400} \frac{X}{2875} \rightarrow 7,2 \text{ µl d'anticòs}$$

Deixem les mostres tota la nit a 4°C

DIA 2

1. Atemperem 10 minuts
2. Rentar 3x5 minuts amb PBS
3. *Envision rabbit* 2-3 gotes 30 minuts
4. Rentar 3x5 minuts amb PBS
5. Revelar amb PBS. 0,6 mg/ml de diaminobenzidina (DAB), 0,5 µl/ml H₂O₂. Màxim 10 minuts, control visual
6. Aturar la reacció introduint els portaobjectes en PBS
7. Rentar en aigua destil·lada
8. Contratació de nuclis amb hematoxilina
10 segons en hematoxilina diluïda
Rentat amb aigua de l'aixeta
5 segons en aigua amoniacal
Rentat amb aigua de l'aixeta
Rentat final amb aigua destil·lada
9. Deshidratar i muntar amb DPX

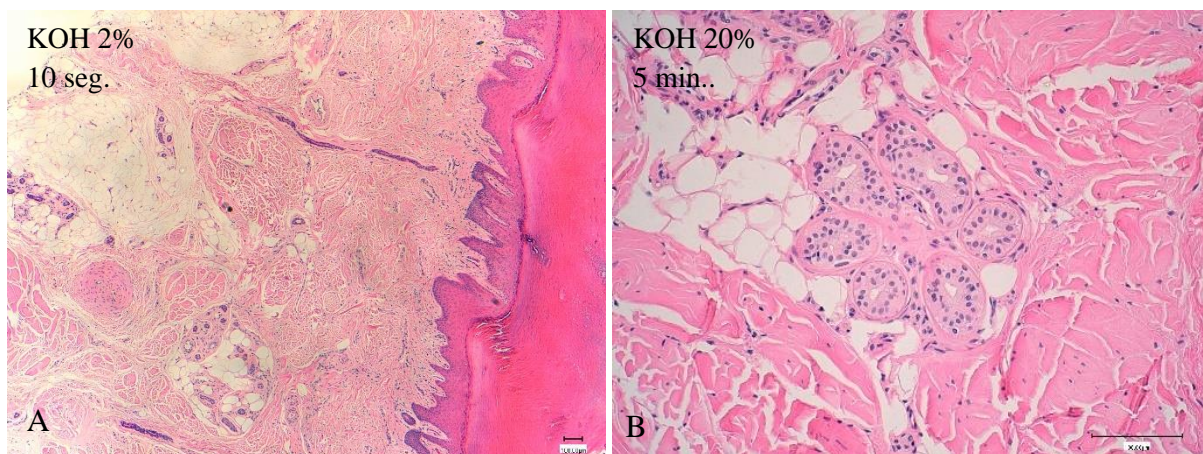


Figura 1. Microfotografia obtinguda al microscòpi òptic d'una secció histològica de pell de dit on s'ha tenyit amb H/E amb un tractament previ amb KOH. KOH 2% 10 segons 10x (A) i 20% KOH 5 minuts 20x (B). Font: autoria pròpia

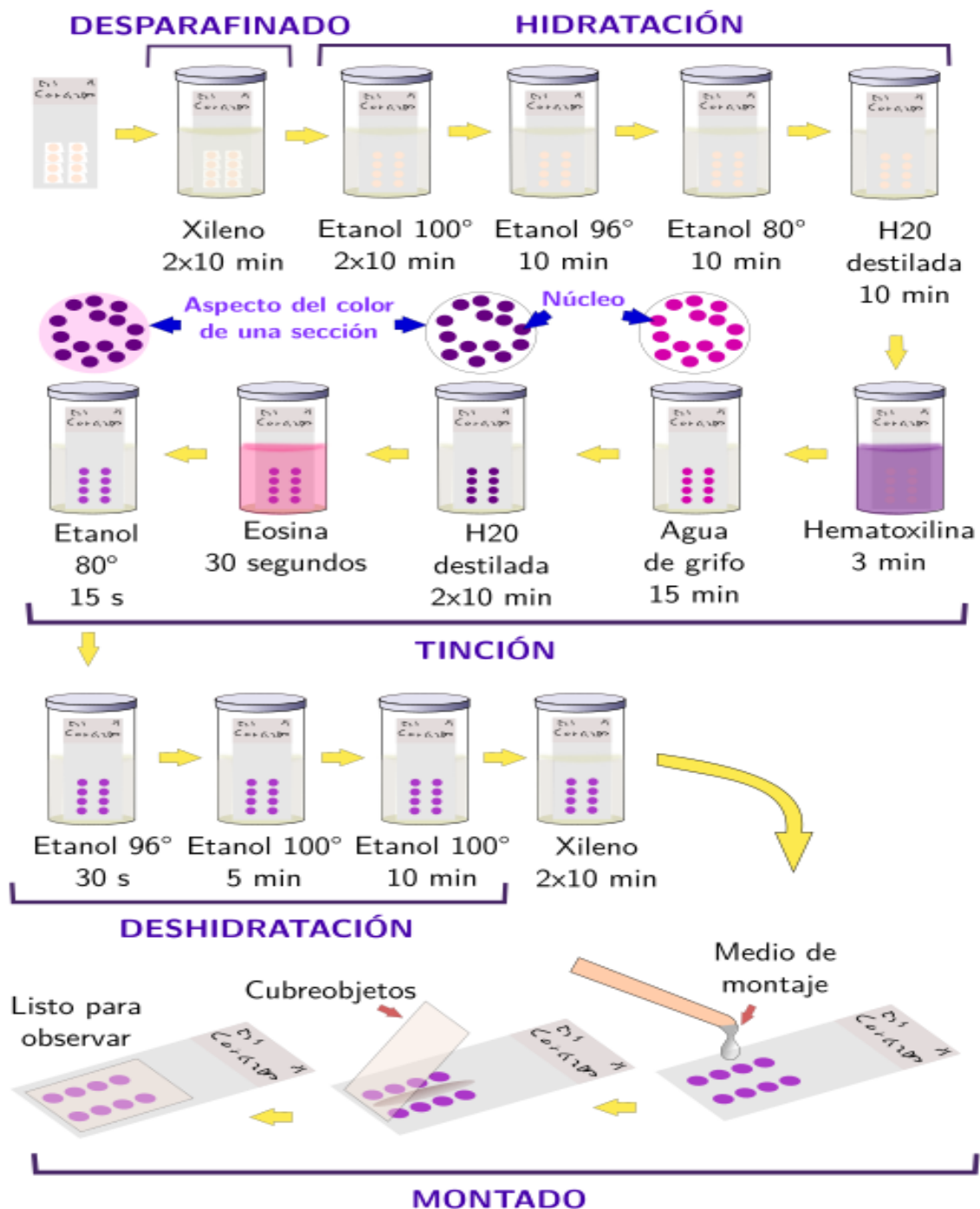


Figura 2. Esquema del protocolo de tinció amb H/E. Durant el desparafinat s'elimina la parafina. El pas amb aigua de l'aixeta s'anomena hidratació i consisteix, gràcies a les sals minerals, en obtenir una coloració blavosa en comptes de lila. La deshidratació final és important perquè el medi de muntatge no és hidrosoluble. El medi de muntatge té unes condicions òptiques òptimes. Un cop aquest procés ha finalitzat, la secció està llesta per ser observada al microscopi òptic. Font: Atlas de histología animal y vegetal ^[18]