



TESIS DOCTORAL

**Bases elementales y moleculares de la
consistencia ungueal. Diseño de un dispositivo
para su determinación**

ESTHER MINGORANCE ÁLVAREZ

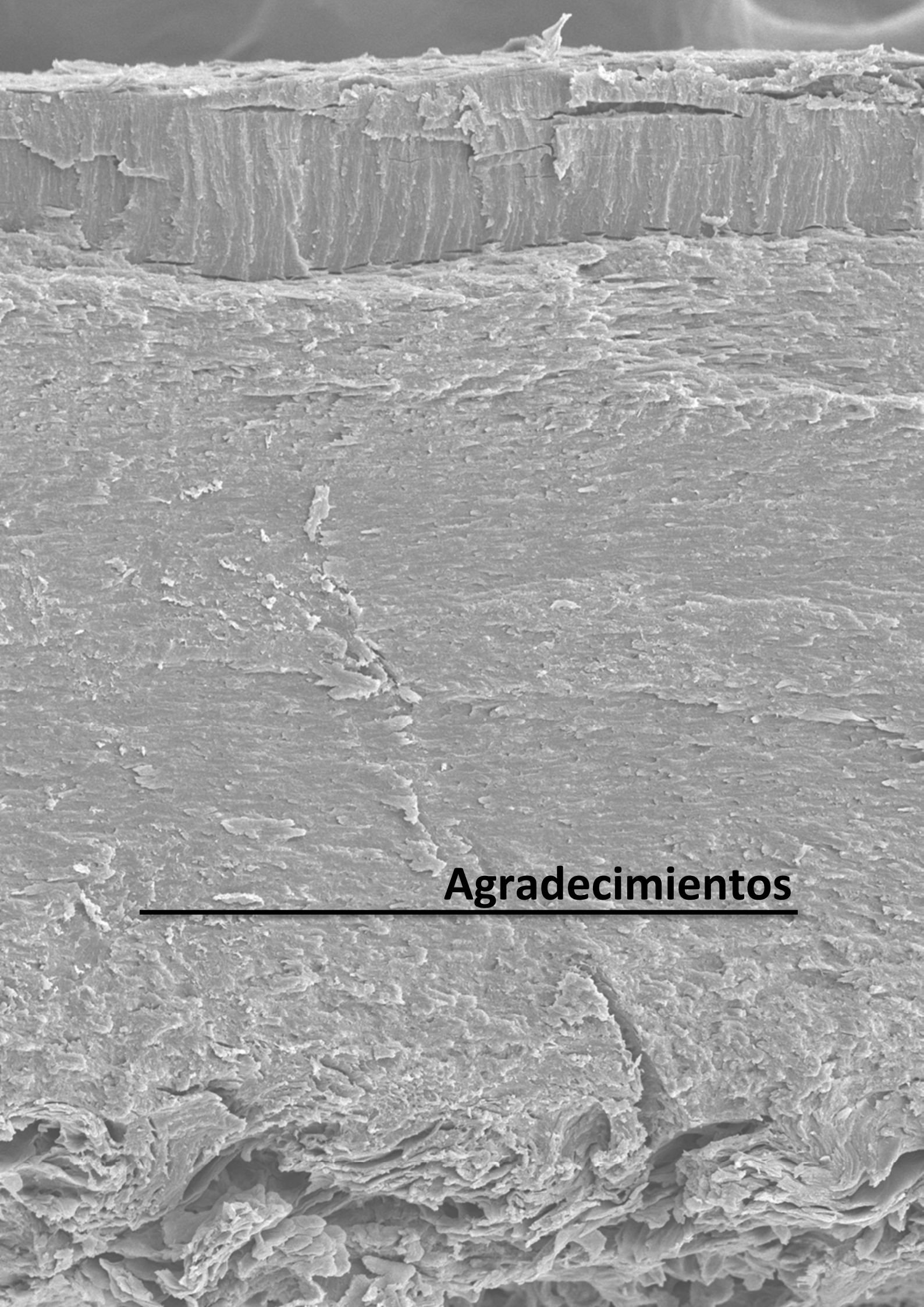
**Programa de doctorado en modelización y
experimentación en ciencia y tecnología**

Conformidad de la directora:

Dra. Dña. Raquel Mayordomo Acevedo

Esta tesis cuenta con la autorización del director/a y coodirector/a de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

2022



Agradecimientos

Por fin ha llegado. Hoy es ese lejano día en el que me siento a escribir unas líneas de agradecimiento, que a todas luces resultan escasas, para reconocer parte de todo lo recibido.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a la Dra. Raquel Mayordomo por una larguísima lista sin fin, que comienza con darme la oportunidad de volver a trabajar en investigación y termina con su trabajo de dirección en esta deseada tesis. Agradezco su apoyo, su capacidad de trabajo, su espíritu científico y su incansable labor como gestora y coordinadora, aspectos sin los cuales este trabajo no habría podido ver la luz. Gracias también por permitirme formar parte del grupo de investigación DEDAP a cuyos integrantes agradezco su cálida acogida y apoyo, especialmente a la Dra. Ana María Pérez que inició esta línea de investigación de la que tanto he aprendido y que siempre ha estado a mi disposición para ayudarme con cualquier aspecto que fuera necesario. También me gustaría agradecer al Dr. Rodrigo Martínez su paciencia conmigo y el esfuerzo por hacerme un hueco para ayudarme con esa esquivia ciencia que es para mí la estadística. Al Dr. Joaquín Martínez por todas sus enseñanzas en materia de inmunohistoquímica, su implicación y apoyo que han sido, sin duda, fundamentales. A los colaboradores en el desarrollo del MCU, especialmente al Dr. Blas Vinagre, a la Dra. Inés Tejado y a D. José Emilio Traver por hacer una idea realidad. A la Dra. Yolanda Gañán por su labor como tutora del programa de doctorado y por atenderme siempre que lo he necesitado, al Dr. Octavio Artieda por ayudarme en mis primeros pasos con la técnica SEM-EDS y a la Dra. María Carbajo por su amplia experiencia en esta técnica.

En segundo lugar, me gustaría agradecer a mis compañeros del Centro Universitario de Plasencia D. Alberto Aldana, D. Pablo González y Dña. Julia Villar todo su apoyo y sus ánimos, ayudándome a seguir cuando más me flaqueaban las fuerzas y a los del Campus Universitario de Badajoz Dra. Guadalupe Álvarez, D. José Antonio de Mera y Dr. Carlos Pascual por acogerme, enseñarme y ayudarme en todo momento. A todas las personas que han participado en este estudio, sin las cuales nada de esto habría sido posible.

Finalmente, agradezco a los que siempre están y estarán, mi familia, que son mi apoyo incondicional, mi fuerza y mi refugio. Os quiero.

A *tí*, que después de todo este tiempo sigues estando, apoyándome y queriéndome.

AT%: porcentaje atómico.

B: uña de consistencia blanda.

BMP: proteínas morfogenéticas óseas.

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad.

CTK17: citoqueratina 17.

D: uña de consistencia dura.

DAPI: 4',6 diamidino 2 fenilindol.

Dsh: Dishevelled.

DT: desviación típica.

Δ : incremento.

ϵ : deformación.

EDS: espectroscopia de dispersión de energía de rayos X.

eV: electronvoltios.

F: fuerza.

FI: filamentos intermedios.

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

gf: gramo-fuerza.

GFAP: proteína ácida fibrilar glial.

h: horas.

HCl: ácido clorhídrico.

H+L: cadena pesada + cadena ligera de las inmunoglobulinas.

HR: humedad relativa.

HRP: peroxidasa de rábano.

HSP: proteínas de choque térmico.

HUGO: organización genoma humano.

IMC: índice de masa corporal.

IgG: inmunoglobulina tipo G.

k: número de cuentas.

K: queratina.

KAP: proteína asociada a los filamentos de queratina.

kDa: kilodalton.

keV: Kilo electronvoltios.

kg: kilogramo.

kJ: kilojulio.

kV: kilovoltio.

L: longitud.

M: molar.

MCU: medidor de consistencia ungueal.

min: minuto.

mm: milímetro.

mM: milimolar.

MTS: tinción tricrómico de Mallory.

mV: milivoltio.

µg: microgramo.

µl: microlitro.

µm: micrómetro.

µs: microsegundo.

m²: metro cuadrado.

n: tamaño muestral.

N: newton.

NaCl: cloruro sódico.

NGS: suero normal de cabra.

NK: asesinas naturales.

nm: nanómetro.

ns: nanosegundo.

Nº: número.

OTC: compuesto para el corte de temperatura óptimo.

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida.

pH: potencial de hidrógeno.

p/v: peso/volumen.

s: segundo.

SDS: dodecil sulfato sódico.

SEM: microscopio electrónico de barrido.

SR: suma de rangos.

σ : tensión.

TBS: tampón tris salino.

Tris: 2 amino 2 hidroximetil propano 1,3 diol.

T^a: temperatura.

ua: unidades arbitrarias.

ULF: unidades de longitud del filamento.

v/v: volumen/volumen.

Wnt: contracción de los nombres de los genes *wingless* e *int*.

WT%: porcentaje de peso húmedo.

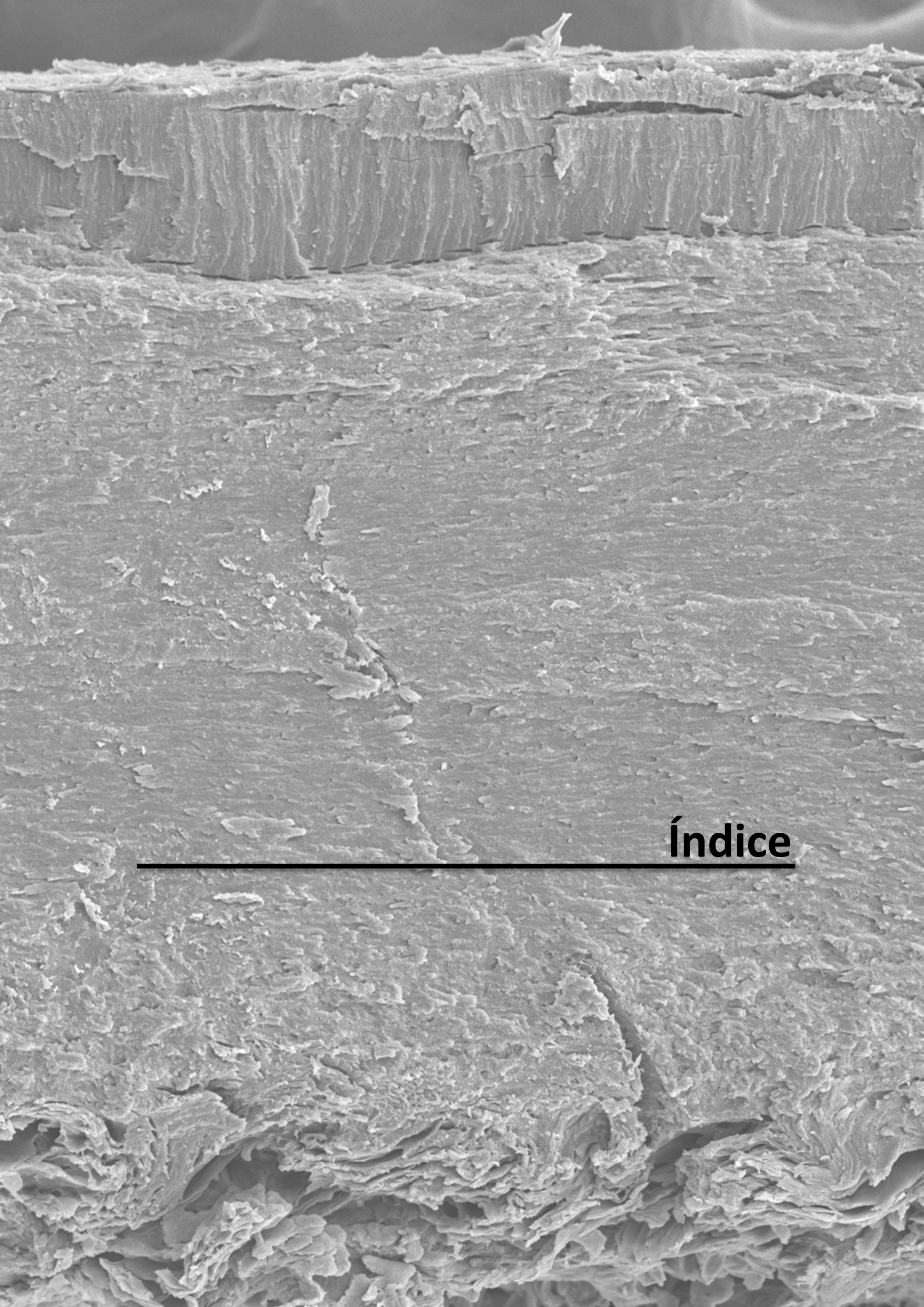
X: aumento.

Y: módulo de Young.

ZAF: número atómico, absorción, fluorescencia.

*: diferencia significativa.

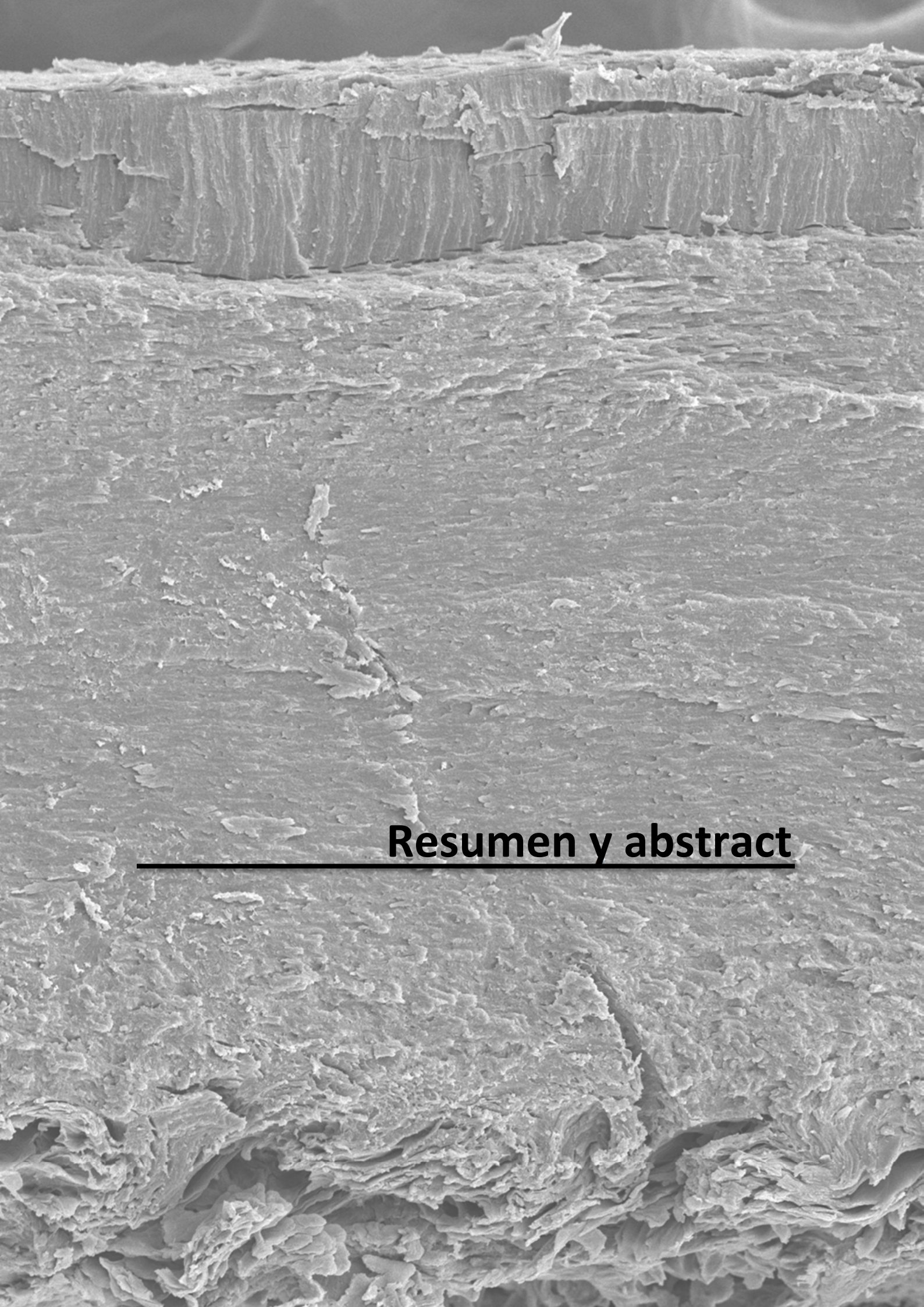
°C: grados centígrados.



Índice

RESUMEN Y ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	6
ANATOMÍA DEL APARATO UNGUEAL	7
EMBRIOLOGÍA DEL APARATO UNGUEAL	9
HISTOLOGÍA DEL APARATO UNGUEAL	10
PROCESO DE CORNIFICACIÓN DE LA LÁMINA UNGUEAL	12
FISIOLOGÍA	15
INMUNOLOGÍA DEL APARATO UNGUEAL	17
FILAMENTOS INTERMEDIOS	19
a) <i>Estructura de los FI</i>	19
b) <i>Clasificación de los FI</i>	21
FILAMENTOS DE QUERATINA	22
a) <i>Ciclo de los filamentos de queratina</i>	25
b) <i>Patrones de expresión de los filamentos de queratina</i>	26
CONSISTENCIA UNGUEAL	27
BIBLIOGRAFÍA	31
CAPÍTULO I	41
INTRODUCCIÓN	42
<i>MICROSCOPIO ELECTRÓNICO</i>	42
<i>MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SEM)</i>	42
<i>SEM CON ESPECTROSCOPIA DE DISPERSIÓN DE ENERGÍA DE RAYOS X (EDS)</i>	43
<i>CONTENIDO AMINOACÍDICO Y ELEMENTAL DE LAS QUERATINAS</i>	44
OBJETIVOS	45
MATERIAL Y MÉTODOS	46
<i>PERMISOS, DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN</i>	46
<i>DETERMINACIÓN DE LA CONSISTENCIA UNGUEAL Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS</i>	47
<i>TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y DETERMINACIÓN DEL GROSOR</i>	47
<i>TRATAMIENTO ESTADÍSTICO</i>	48
RESULTADOS	49
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES	59
BIBLIOGRAFÍA	60
CAPÍTULO II	62
INTRODUCCIÓN	63
<i>QUERATINAS: FI DE TIPO I Y II</i>	63
<i>SOLUBILIZACIÓN Y DESNATURALIZACIÓN DE LAS QUERATINAS</i>	64
<i>PATRONES DE EXPRESIÓN DE QUERATINAS EN EL APARATO UNGUEAL</i>	65
OBJETIVOS	67
MATERIAL Y MÉTODOS	68
<i>PERMISOS, DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN</i>	68
<i>DETERMINACIÓN DE LA CONSISTENCIA UNGUEAL Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS</i>	69
ANTICUERPOS	69
PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS E INMUNOBLOT	70
<i>PROCESAMIENTO DEL TEJIDO UNGUEAL Y OBTENCIÓN DE SECCIONES</i>	72
<i>INMUNOHISTOQUÍMICA</i>	73
<i>ADQUISICIÓN, PROCESAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE IMÁGENES</i>	73
a) <i>Inmunoblot</i>	73
b) <i>Inmunohistoquímica</i>	73

SEM	74
TRATAMIENTO ESTADÍSTICO Y VARIABLES DE ESTUDIO	74
a) <i>Inmunoblot</i>	74
b) <i>Inmunohistoquímica</i>	74
RESULTADOS	75
EXTRACCIÓN PROTEICA EN CONDICIONES REDUCTORAS	75
NIVEL DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EXTRAÍDAS EN CONDICIONES REDUCTORAS	77
PROCESAMIENTO DEL TEJIDO UNGUEAL E HISTOLOGÍA	79
DISCUSIÓN.....	84
CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFÍA	90
CAPÍTULO III.....	93
INTRODUCCIÓN	94
PROPIEDADES MECÁNICAS DE LOS MATERIALES	94
CONDICIONES AMBIENTALES Y PROPIEDADES MECÁNICAS DE LA LÁMINA UNGUEAL	96
MODELO VISCOELÁSTICO DE ORDEN FRACCIONARIO	97
DISPOSITIVOS DE MEDIDA DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DE LAS LÁMINAS UNGUEALES	97
OBJETIVOS.....	99
MATERIAL Y MÉTODOS	100
PERMISOS, CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS Y LOS ENSAYOS	100
DETERMINACIÓN DE LA CONSISTENCIA UNGUEAL.....	102
a) <i>Método de referencia para la determinación de la consistencia ungueal</i>	102
b) <i>Determinación de la consistencia ungueal mediante el MCU</i>	102
TRATAMIENTO ESTADÍSTICO Y VARIABLES DE ESTUDIO	104
RESULTADOS	105
DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONSISTENCIA UNGUEAL.....	106
ENSAYOS DE REPETICIONES CON TESTIGOS Y PARTICIPANTES DE REFERENCIA	107
ENSAYOS DE MEDIDA ÚNICA CON JÓVENES Y ADULTOS.....	111
ENSAYOS DE REPETICIÓN CON TESTIGOS Y CONDICIONES VARIABLES DE T^a Y HR	117
DISCUSIÓN.....	121
CONCLUSIONES	125
BIBLIOGRAFÍA.....	126
CONCLUSIONES FINALES.....	128
FINAL CONCLUSIONS.....	128
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	131
ARTÍCULOS CIENTÍFICOS.....	132
PATENTE.....	132
ANEXOS	134



Resumen y abstract

El aparato ungueal es un complejo anejo cutáneo de origen epidérmico dispuesto sobre la región dorsal de las falanges distales de los dedos. Sus alteraciones constituyen uno de los motivos de consulta más frecuentes para los profesionales de la dermatología y de la podología, lo que justifica la importancia de su estudio y su amplio uso como modelo en investigación. Una de las estructuras esenciales de este aparato es la lámina ungueal, compuesta por células denominadas onicocitos que se organizan en una estructura multicelular funcional y biológicamente muerta, con tres capas: dorsal, intermedia y ventral. Se trata de células ricas en queratina, un tipo de filamento intermedio embebido en una matriz proteica y fuertemente compactadas entre sí, lo que dificulta su manejo experimental.

La consistencia ungueal es una característica de la lámina ungueal poco estudiada hasta la fecha, que nace de la necesidad de realizar una exploración más completa de la uña junto a la forma, el color u otras características generalmente evaluadas que pueden ser útiles en el diagnóstico preventivo de determinadas patologías sistémicas y ungueales. Por tanto, se propuso abordar las bases elementales y moleculares de la consistencia ungueal, así como diseñar un dispositivo que permitiera determinar esta característica de forma cuantitativa.

El análisis de la composición elemental se realizó mediante microscopía electrónica de barrido con espectroscopia de dispersión de energía de rayos X en una muestra de 59 participantes. Se identificaron un total de 12 elementos, aunque no todos ellos fueron detectados en todas las capas analizadas. Los resultados obtenidos permitieron elaborar un modelo predictivo de la consistencia ungueal en el que el nivel de calcio en la capa dorsal fue la principal variable predictora, con un porcentaje de casos clasificados correctamente del 75,4%.

A nivel molecular, los inmunoblots y los análisis inmunohistoquímicos con dos anticuerpos frente a queratinas de tipo I (AE13: frente a queratinas de pelo y citoqueratina 17: frente a queratinas epiteliales) se realizaron sobre una muestra de 32 participantes. Los resultados obtenidos de ambas técnicas fueron congruentes y demostraron que las uñas de consistencia dura contienen mayor cantidad de queratina 17 que las uñas de consistencia blanda (p -valores ≤ 0.026), aunque no se observaron diferencias significativas con el anticuerpo AE13.

Finalmente, se diseñó un dispositivo para la determinación cuantitativa de la consistencia ungueal (MCU) y se realizaron análisis iniciales para estudiar el comportamiento mecánico de láminas ungueales con distinta consistencia ungueal, trabajando con distintas muestras y diferentes tipos de ensayo. Se detectaron diferencias significativas atendiendo a la consistencia ungueal en los participantes de referencia con ensayos de repetición (p -valores ≤ 0.05) y entre participantes jóvenes con los ensayos de medida única (p -valores ≤ 0.044). Asimismo, se puso de manifiesto la importancia de controlar las condiciones ambientales de temperatura y humedad relativa a la hora de trabajar con el MCU. Sin embargo, consideramos necesario profundizar en los estudios realizados con el MCU y abordar algunas áreas de mejora con el objetivo de desarrollar un dispositivo útil para los profesionales de la salud.

The nail apparatus is a complex cutaneous appendage of epidermic origin located in the dorsal region of the distal phalanges of the digits. Disorders of the nail apparatus are one of the most frequent reasons for dermatology and podiatry consultations, indicating the importance of studying the nail apparatus and its widespread use as a model in research. One of the essential structures of this apparatus is the nail plate, comprising cells known as onychocytes that are organised in a multicellular, functionally and biologically dead structure with three layers: the dorsal, intermediate and ventral layers. These tightly packed cells are rich in keratin, a type of intermediate filament embedded in a protein matrix, and are difficult to handle experimentally.

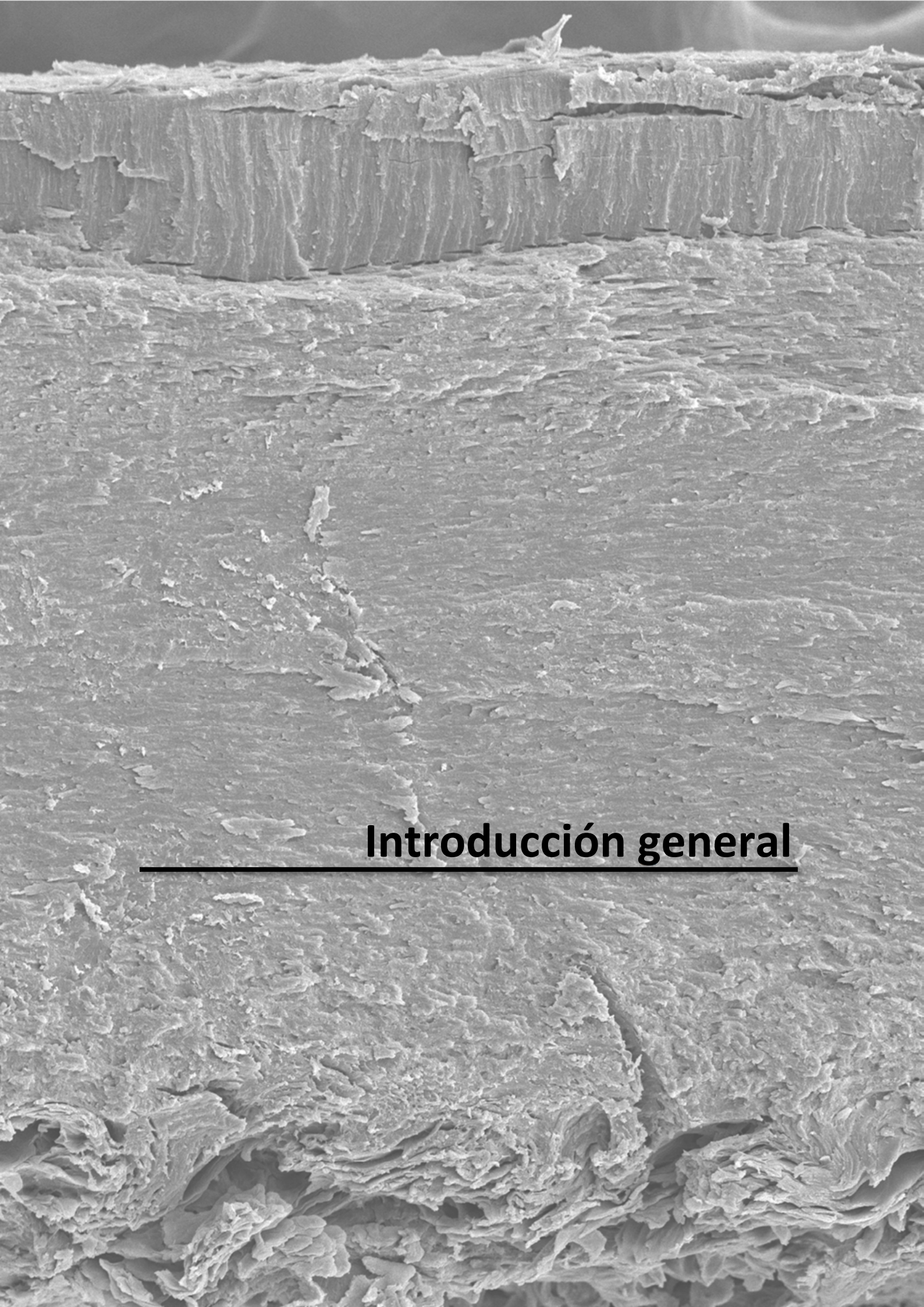
Nail consistency is a little studied characteristic of the nail plate. Its study has stemmed from the need for more thorough examination of the nail in addition to shape and colour and other typically assessed characteristics used in preventive diagnosis of nail disorders and systemic diseases. We therefore addressed the elemental and molecular bases of nail consistency and designed a device to determine this characteristic quantitatively.

Elemental composition was analysed using scanning electron microscopy with energy dispersive X-ray spectroscopy in a sample of 59 participants. Twelve elements were identified, although not all of them were detected in all the layers analysed. With the results obtained we created a predictive model of nail consistency in which the level of calcium in the dorsal layer was the main predictive variable, with a percentage of correctly classified cases of 75.4%.

At molecular level, immunoblots and immunohistochemical analyses with two antibodies against Type I keratins (AE13: against hair keratins and cytokeratin; 17: against epithelial keratins) were performed on a sample of 32 participants. The results obtained using both techniques were congruent and demonstrate that hard consistency nails contain a larger amount of keratin 17 than soft consistency nails ($p\text{-values} \leq 0.026$), although no significant differences were observed with the AE13 antibody.

Lastly, a Nail Consistency Measuring (NCM) device was designed to quantitatively determine nail consistency and initial analyses were conducted to study the mechanical behaviour of nail plates with different nail consistencies, working with various samples

and different types of testing. Significant differences by nail consistency were detected in the reference participants with repeated measures tests ($p\text{-values}\leq 0.05$) and between young participants with single measure tests ($p\text{-values}\leq 0.044$). In addition, the importance of controlling the ambient conditions of temperature and relative humidity when working with the NCM device was noted. However, we consider it necessary to conduct further studies with the device, and some areas of improvement must be addressed to develop a useful device for health professionals.



Introducción general

El aparato ungueal, conocido comúnmente como uña, es un complejo anejo cutáneo de origen epidérmico, con gran diversidad funcional (McCarthy, 2004). Se localiza en la región dorsal de las falanges distales de los dedos a los cuales protege (Runne y Orfanos, 1981; McCarthy, 2004). Junto con los componentes epiteliales, encontramos estructuras de vascularización e inervación, con importantes funciones sensoriales (Haneke, 2006, 2015) y termorreguladoras, como las desempeñadas por los numerosos cuerpos glómicos presentes en el tejido subungueal (Sargon *et al.*, 2003). Además, el aparato ungueal favorece la sensación propioceptiva a través de la contrapresión (Zook, 2002), participa en la manipulación de objetos (Stegink Jansen *et al.*, 2000), sirve como herramienta o arma (Baden, 1970) y desempeña un papel primordial en el control postural (Jeka y Lackner, 1994).

A nivel clínico, las alteraciones del aparato ungueal u onicopatías constituyen uno de los motivos de consulta más frecuentes para los profesionales de la dermatología y de la podología (Tabassum *et al.*, 2020), afectando también a la autoestima, a la imagen personal y a las relaciones interpersonales (Belyayeva *et al.*, 2013). De ahí la importancia de su estudio científico y su amplio uso como modelo en la investigación.

Anatomía del aparato ungueal

A nivel anatómico, el aparato ungueal ha sido ampliamente estudiado y está bien caracterizado (Rainey, 1849; Runne y Orfanos, 1981; Achten y Parent, 1983; Fleckman y Allan, 2001; McCarthy, 2004; Perrin *et al.*, 2004; Haneke, 2006; de Berker, 2013; Fleckman *et al.*, 2013; Haneke, 2015). Comprende distintos elementos con diferentes estructuras, funciones y niveles de queratinización (Figura 1 y Figura 2).

Los tres pliegues que enmarcan la lámina ungueal son rodetes cutáneos, que le aportan soporte y guían su correcto crecimiento. El pliegue proximal se continúa distalmente con la cutícula, que consiste en una franja estrecha y translúcida de tejido epidérmico que ancla el pliegue proximal a la lámina ungueal, evitando la entrada de posibles agentes exógenos. Esta cutícula se sintetiza mayoritariamente en el eponiquio o región ventral del pliegue proximal (Perrin *et al.*, 2004; Haneke, 2006; de Berker, 2013) (Figura 1).

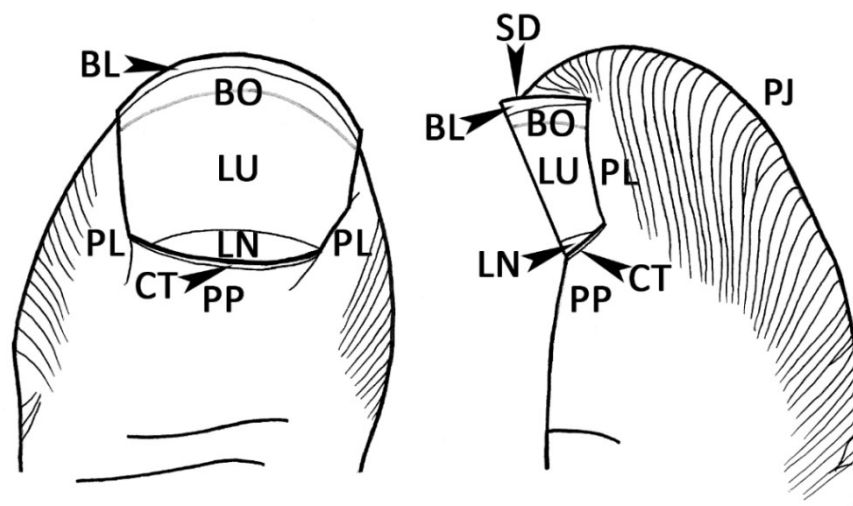


Figura 1. Ilustración descriptiva del aparato ungueal en visión frontal y lateral. CT: cutícula, BL: borde libre, BO: banda onicodérmica, LN: lúnula, LU: lecho ungueal, PJ: pulpejo, PL: pliegue lateral, PP: pliegue proximal, SD: surco distal.

Ventralmente, el pliegue proximal se continúa con la matriz ungueal, que es el epitelio germinativo de la lámina ungueal, y que se extiende hasta la lúnula. En la matriz ungueal se diferencian tres regiones: la matriz dorsal, que es la región ventral del pliegue proximal, la matriz intermedia o germinativa, que se dispone replegada sobre la incipiente lámina ungueal proximal y la matriz ventral, que conecta la matriz intermedia con el lecho ungueal. La ubicación de la matriz ungueal está próxima a la inserción del tendón extensor de la falange distal (Zook, 2002), por lo que las intervenciones quirúrgicas a este nivel deben ser muy precisas (Figura 2).

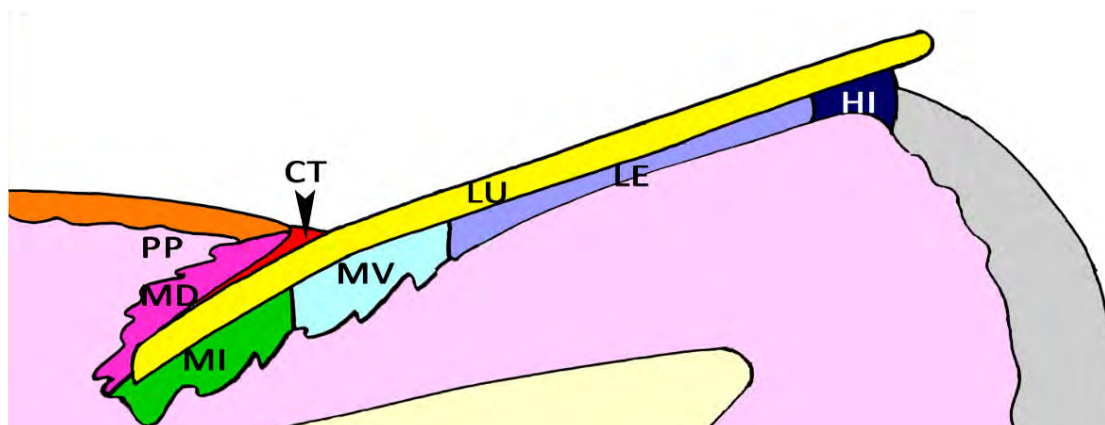


Figura 2. Ilustración de una sección del aparato ungueal. CT: cutícula, HI: hiponiquio, LE: lecho ungueal, LU: lámina ungueal, MD: matriz dorsal, MI: matriz intermedia, MV: matriz ventral, PP: pliegue proximal.

Diversos trabajos han intentado dilucidar qué estructuras del aparato ungueal generan la lámina ungueal y cuáles sirven sólo de soporte, especialmente en el caso de la matriz y del lecho ungueal. Sin embargo, todavía no se dispone de un consenso al respecto, de forma que algunos autores sostienen que la matriz es la responsable, casi en exclusiva, de la producción de la lámina ungueal (Zaias y Alvarez, 1968; Norton, 1971; de Berker y Angus, 1996; de Berker, Mawhinney, *et al.*, 1996), mientras que otros autores proponen que además de la matriz, existen otras estructuras que intervienen de forma importante en la formación de la lámina ungueal, especialmente el lecho ungueal (Lewis, 1954; Johnson *et al.*, 1991).

La lúnula tiene forma de medialuna blanquecina y es visible externamente a través del dorso de la lámina ungueal, especialmente en el primer dedo de las manos. Bajo la lámina a la cual se encuentra fuertemente unida, se extiende el lecho ungueal desde la lúnula hasta el hiponiquio. Esta estructura se caracteriza por su color rosado debido a la profusa vascularización dérmica subyacente, y se distingue en ella distalmente una estrecha banda, de color más intenso, denominada banda onicodérmica con funciones de protección análogas a las descritas para la cutícula. Debido a la proximidad de la matriz y del lecho ungueal al periostio de la falange distal, cualquier irregularidad del hueso debida a fracturas desplazadas, crecimiento de tumores, exostosis, etc. puede verse acompañada de deformaciones del aparato ungueal (Zook, 2002). El hiponiquio se extiende distalmente desde la banda onicodérmica hasta el surco distal, que separa las estructuras subungueales del tejido epidérmico propio del pulpejo.

Finalmente, la lámina ungueal está compuesta por un tejido altamente cornificado, resultado de la acumulación de varias capas de onicocitos ricos en queratina y que adquiere una forma ligeramente curvada para adaptarse mejor a la superficie dorsal del extremo distal de los dedos. A la parte distal de la lámina ungueal, que no está unida al lecho ungueal y que por tanto puede ser cortada se denomina borde libre.

Embriología del aparato ungueal

A partir de la sexta semana de gestación se pueden distinguir los dedos de las manos dispuestos en forma de abanico y posteriormente, ya en la séptima semana, a

partir de los 52 días de gestación, se diferencian los de los pies (Suchard, 1882). Sin embargo, es necesario esperar hasta la octava semana de gestación para poder observar los dedos ya separados, al reabsorberse las membranas interdigitales (Lewis, 1954).

Los primeros elementos embrionarios del aparato ungueal aparecen en la décima semana de gestación (Zander, 1886) como un engrosamiento de la epidermis embrionaria, gracias a la compleja interacción entre la epidermis y el tejido mesenquimático subyacente. A medida que los dedos se elongan, se desarrollan dorsalmente los pliegues ungueales proximal y laterales, definiendo el campo ungueal. En la decimocuarta semana de gestación, la lámina ungueal es reconocible como consecuencia de la activa e intensa queratinización del tejido y está cubierta inicialmente por una fina capa de células procedentes del eponiquio. Este eponiquio sufrirá posteriormente, un proceso de degeneración quedando más limitado en el aparato ungueal adulto (McCarthy, 2004). En la decimoséptima semana de gestación, el crecimiento de la lámina ungueal sobre la cresta distal transforma esta estructura en el hiponiquio definitivo (Zaias, 1963).

El ligero retraso con el que se inicia el desarrollo de los dedos de los pies con respecto a los de las manos se mantiene hasta el completo desarrollo de los aparatos ungueales (Munteanu *et al.*, 2021). De forma que, en la trigésimo segunda semana de gestación finaliza el proceso para los aparatos ungueales de las manos, pero no es hasta cuatro semanas después, en la trigésimo sexta semana de gestación, cuando finaliza este proceso en los dedos de los pies (McCarthy, 2004).

Histología del aparato ungueal

Al tratarse de un anejo cutáneo, muchas de las estructuras del aparato ungueal no presentan diferencias reseñables con la histología propia de la piel (de Berker, 2013). Así, los pliegues laterales y la región dorsal del pliegue proximal presentan una histología similar a la de la piel glabra, excepto por el incremento notable de la queratinización en el grueso estrato córneo que es la cutícula (Andre *et al.*, 2013).

Tanto la matriz como el lecho ungueal comparten una misma característica, la ausencia del estrato granuloso característico del tejido epidérmico, si bien ambas estructuras presentan, entre sí, diferencias histológicas. Por ejemplo, en la matriz

ungueal el epitelio estratificado escamoso es de mayor grosor que el epitelio del lecho ungueal, reducido a una capa basal de queratinocitos postmitóticos y una o dos capas de células suprabasales (Jarrett y Spearman, 1966; Mecklenburg *et al.*, 2004). En relación con las papilas dermoepidérmicas, que son las estructuras que dotan de mayor resistencia a la unión entre la epidermis superior y la dermis subyacente al incrementar la superficie de contacto entre ambas superficies, son más profundas en el lecho que en la matriz ungueal. Además, las papilas presentes en el lecho se caracterizan por estar dispuestas únicamente en el eje longitudinal, por lo que adquieren la denominación de crestas (Martin y Platts, 1959). También se han identificado diferencias en la dermis subyacente a la matriz y al lecho ungueal, en concreto, se ha detectado la presencia de conductos sudoríparos únicamente en la región más distal del lecho ungueal (Maricq, 1967), si bien la dermis de ambas estructuras se caracteriza por presentar un contenido moderado de adipocitos, la ausencia de glándulas sebáceas y de folículos pilosos (Lewin, 1965). Otra de las notables diferencias entre la matriz y el lecho ungueal hace referencia a un tipo celular concreto, los melanocitos. La presencia de estas células es abundante en la matriz (Hashimoto, 1971), mientras que en el lecho ungueal son mucho menos numerosas (Tosti *et al.*, 1994) o incluso inexistentes (de Berker, Graham, *et al.*, 1996). Por último, para finalizar con el análisis de las diferencias entre ambas estructuras, la expresión de distintos tipos de queratinas también depende del tejido. Así, en la matriz ungueal se han detectado queratinas de pelo, que son aquellas presentes en anejos cutáneos como el pelo y las láminas ungueales, mientras que en el lecho ungueal sólo se han detectado queratinas epiteliales (Perrin *et al.*, 2004).

Respecto a la histología de la lámina ungueal, se trata de una estructura multilaminar cuyo grosor aumenta distalmente (Johnson *et al.*, 1991; de Berker, Mawhinney, *et al.*, 1996) y en la que se diferencian una capa dorsal, intermedia y ventral, dispuestas en planos diferentes y superpuestos (Lewis, 1954; Runne y Orfanos, 1981; Kobayachi *et al.*, 1999; Farren *et al.*, 2004). De tal forma que, la capa dorsal está en contacto con el medio externo y está más expuesta a agresiones, la capa ventral es la más interna y está en contacto con la matriz y el lecho ungueal, y la capa intermedia que se dispone entre las dos capas anteriores.

Estas capas también se diferencian en sus grosores relativos y en la orientación que adquieren los filamentos de queratina en las células que las componen. De tal forma que, la capa intermedia es la que presenta un grosor relativo mayor en comparación con las capas dorsal y ventral (dorsal:intermedia:ventral/3:5:2) (Kobayachi *et al.*, 1999). Con respecto a la orientación de los filamentos de queratina, la disposición es aleatoria en las capas dorsal y ventral, y paralela al pliegue proximal en la capa intermedia (Farran *et al.*, 2008). Esta disposición particular de los filamentos de queratina junto con la distribución asimétrica de los grosores relativos por capas permite que las fracturas generadas, como consecuencia de las fuerzas ejercidas sobre la lámina ungueal, se canalicen lateralmente y no de forma perpendicular en dirección al borde proximal. El significado biológico de esta disposición es clave, ya que protege la integridad de la lámina y del lecho ungueal, que son estructuras vivas y fundamentales para el correcto funcionamiento del aparato ungueal, canalizando las fracturas de la lámina ungueal paralelamente al borde libre (Farren *et al.*, 2004) y alejándolas de estas estructuras fundamentales para la síntesis de la lámina ungueal (Lewis, 1954; Zaias y Alvarez, 1968).

Proceso de cornificación de la lámina ungueal

Todo proceso de cornificación implica un proceso de queratinización previo, así como la sustitución progresiva de los orgánulos celulares por un compacto citoesqueleto proteico y fuertes estructuras de unión intercelular, con el objetivo de desarrollar una estructura multicelular funcional pero biológicamente muerta (Eckhart *et al.*, 2013). Se trata, por tanto, de un proceso de muerte celular programada especial, en el que las células muertas no son fagocitadas o desintegradas (Jäger *et al.*, 2007), sino que se acumulan y entrelazan para formar una cubierta protectora.

En la lámina ungueal, las células completamente diferenciadas y llenas de queratina se denominan onicocitos y se diferencian de los corneocitos típicos de otros tejidos queratinizados como la piel en que los primeros permanecen más firmemente unidos, mientras que los corneocitos se descaman más fácilmente (Andre *et al.*, 2013). A esto hay que añadir que el proceso de diferenciación de los queratinocitos de la matriz ungueal en onicocitos difiere ligeramente del proceso observado en los queratinocitos

epidérmicos (Jäger *et al.*, 2007), poniendo de manifiesto ciertas características propias del proceso de cornificación del aparato ungueal.

El proceso de cornificación comienza cuando las células madre basales alcanzan el nivel de queratinización, momento en el que contienen numerosos ribosomas y retículo endoplasmático rugoso, requeridos para la intensa síntesis proteica, mientras que la mayoría de los orgánulos celulares como el núcleo o las mitocondrias muestran algunos signos degenerativos (Hashimoto, 1971), como cambios en la forma nuclear (Jäger *et al.*, 2007), indicativos de que el proceso de queratinización se ha iniciado.

El progresivo ensamblaje y acumulación de los filamentos de queratina en el citoplasma se desarrolla paralelamente al proceso de aplanamiento celular, de forma que los onicocitos de las capas ventrales presentan mayores grosores celulares que los de las capas dorsales. A medida que progresan en el proceso, las numerosas interdigitaciones poco profundas presentes entre las células de las capas inferiores se vuelven menos frecuentes y más profundas en las capas más dorsales (Parent *et al.*, 1985). También se asocia al proceso de cornificación del aparato ungueal un incremento progresivo de la condensación de la cromatina nuclear a lo largo de varias capas de la matriz ungueal (Jäger *et al.*, 2007), así como una mayor presencia de los espacios intercelulares denominados dilataciones ampulares, de forma que son más frecuentes entre los onicocitos de las capas dorsales que entre los de las capas más ventrales (Parent *et al.*, 1985), a pesar de que las únicas uniones intercelulares detectadas en la lámina ungueal son los desmosomas (Caputo *et al.*, 1982) (Figura 3).

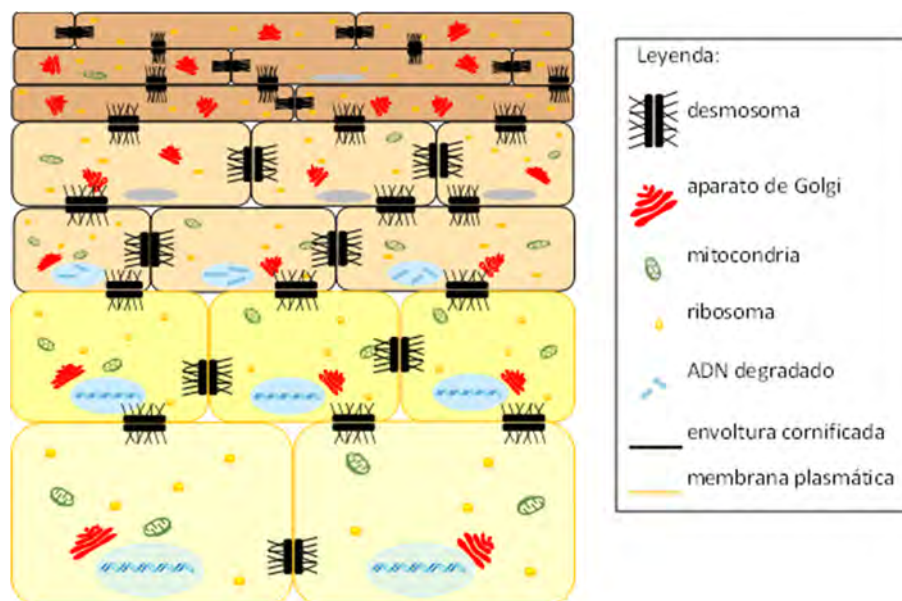


Figura 3. Ilustración esquemática del proceso de cornificación de la lámina ungueal. A medida que se acumulan las queratinas en el citoplasma, las células se aplanan, se produce la autofagia de la mayoría de los orgánulos celulares, así como la degradación del material genético y se desarrollan las envolturas celulares cornificadas.

Junto al desarrollo de este complejo andamiaje proteico citoplasmático, las células epiteliales de la epidermis, pelo y uña, desarrollan otra compleja estructura denominada envoltura celular cornificada (Baden y Kvedar, 1993). Se trata de una estructura proteica especializada que sustituye a la membrana plasmática en los queratinocitos totalmente diferenciados y que está unida covalentemente a lípidos en su parte externa y a los filamentos de queratina citoplasmáticos en su cara interna (Steinert y Marekov, 1995).

El mecanismo de autofagia paralelo al proceso de cornificación de la lámina ungueal y responsable del remodelado intracelular al que son sometidos los onicocitos, también ha sido estudiado en modelos animales. De hecho, la supresión de la autofagia en ratones ha puesto de manifiesto alteraciones en el proteoma celular. En concreto, se ha identificado un incremento en la cantidad de enzimas y otras proteínas no estructurales que se mantienen en el tejido queratinizado, mientras que las queratinas y las proteínas asociada a los filamentos de queratina (KAP) se mantienen o incluso, disminuyen (Jaeger *et al.*, 2019), demostrando la importancia de este proceso en el correcto desarrollo de la cornificación.

Dentro de las características propias del proceso de cornificación en el aparato ungueal, que no se dan en otros epitelios, cabe mencionar:

La ausencia de los gránulos de queratohialina (Hashimoto, 1971) típicos del estrato granuloso de la epidermis (Matoltsy, 1975), como consecuencia directa de la ausencia de este estrato tanto en la matriz como en el lecho ungueal. La importancia de estos gránulos en el proceso de queratinización reside en que contienen grandes cantidades de profilagrina, que es el precursor de la proteína filagrina (Dale *et al.*, 1985), una KAP que interviene en la agregación de los filamentos de queratina mediante mecanismos aún no descritos totalmente (Sandilands *et al.*, 2009). Sin embargo, la ausencia de filagrina en la lámina ungueal no implica que otras KAP no conformen la

matriz amorfa en el que se encuentran embebidos los filamentos de queratina. De hecho, se ha detectado un elevado porcentaje de KAP en el análisis proteómico de la lámina ungual (Rice *et al.*, 2010).

Sorprendentemente, no se ha detectado la presencia de la caspasa 14 en la diferenciación de los queratinocitos de la matriz y del lecho ungual (Jäger *et al.*, 2007), siendo esta proteína imprescindible para la diferenciación terminal y la cornificación en otros epitelios (Demerjian *et al.*, 2008).

El patrón de expresión de una desoxirribonucleasa (DNase I-like 2) en el aparato ungual es diferencial. Esta proteína está implicada en la degradación del material genético nuclear durante la cornificación de los queratinocitos epidérmicos (Fischer *et al.*, 2007) y se ha demostrado que su expresión aumenta en el pliegue proximal y en las capas más superficiales de la matriz ungual, mientras que reduce drásticamente en los queratinocitos del lecho ungual (Jäger *et al.*, 2007).

Fisiología

El patrón de crecimiento de la lámina ungual es continuo a lo largo de la vida, a diferencia de otros anejos cutáneos como el pelo que presenta un patrón de crecimiento cíclico, alternando fases de crecimiento y de reposo (Runne y Orfanos, 1981). Para la regulación de los procesos de diferenciación y el mantenimiento de la homeostasis del aparato ungual es necesaria la intervención de numerosas moléculas y rutas metabólicas, entre las que destacan las moléculas: Wnt, Notch, Bmp (Figura 4).

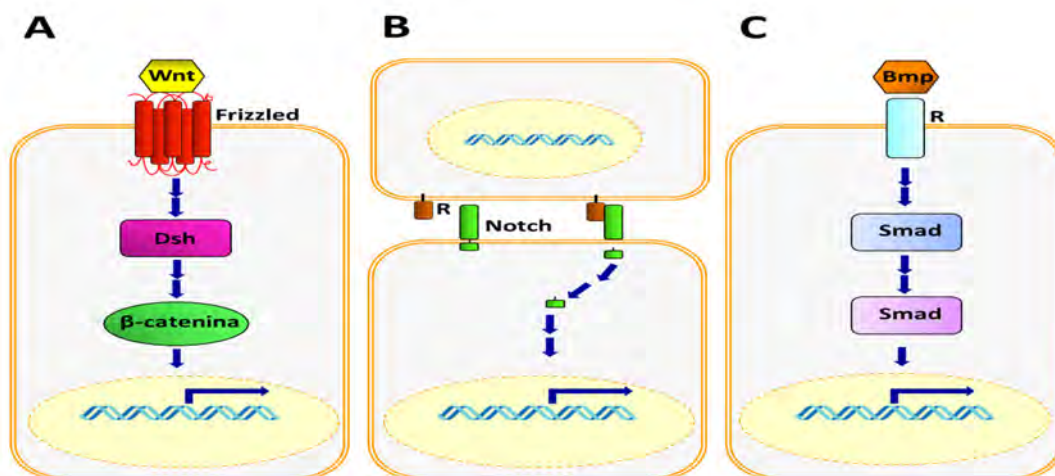


Figura 4. Ilustración esquemática de 3 rutas de diferenciación y mantenimiento de la homeostasis del aparato ungual. A: ruta mediada por Wnt, B: ruta mediada por Notch, C: ruta mediada por Bmp. R: receptor. Flechas: activación.

Bajo el nombre de Wnt (contracción de la denominación de los genes *wingless* e *int*) se engloba una familia de glicoproteínas con importantes funciones de señalización en distintas rutas metabólicas. Se han identificado tres tipos de vías diferentes, sin embargo, en todas ellas intervienen proteínas Wnt interactuando extracelularmente con receptores transmembrana de la familia Frizzled, los cuales a su vez y después de ser activados, interactúan con las proteínas citoplasmáticas de la familia DSH (Dishevelled) responsables de la transducción de la señal intracelularmente (Huelsenken y Behrens, 2002).

En la vía canónica, la activación de Dsh inhibe la degradación de las β -cateninas, que actúan a nivel nuclear activando la transcripción de los genes diana (Saito *et al.*, 2012). La importancia de esta molécula Wnt en el desarrollo de los miembros en vertebrados es fundamental, pues se ha demostrado que la expresión diferencial de Wnt7a está relacionada con los procesos de desarrollo de la polaridad dorsal-ventral (Riddle *et al.*, 1995). Además, se han establecido relaciones directas entre mutaciones en diferentes elementos de esta vía de señalización y enfermedades o defectos genéticos de las falanges y del desarrollo del aparato ungueal (Blaydon *et al.*, 2006; Naz *et al.*, 2012; Takeo *et al.*, 2013; Wilson *et al.*, 2013), lo que refuerza la teoría de que las vías de señalización mediadas por Wnt intervienen tanto en la embriogénesis como en el mantenimiento de los tejidos en adultos (Saito *et al.*, 2012).

Otra ruta que considerar es la regulada mediante las proteínas Notch. Estas proteínas transmembrana contienen un dominio intracelular y se localizan en células distintas a las de su ligando, también unido a la membrana plasmática de otras células. La interacción entre ambas moléculas unidas a la membrana plasmática de diferentes células activa la liberación del dominio intracelular de Notch mediante el corte proteolítico de su secuencia aminoacídica. Este dominio intracelular en conjunto con otras proteínas induce la transcripción de los genes diana en el núcleo (Bray, 2006). Un ejemplo de la importancia de esta ruta de regulación en la homeostasis del aparato ungueal se ha puesto de manifiesto en ratones, en los que tras activar la expresión de Notch en la región queratogénica se ha observado un incremento en la longitud de las láminas ungueales (Lin y Kopan, 2003).

Por último, abordaremos la ruta regulada por las proteínas BMP (bone morphogenetic proteins). Estas proteínas son factores de crecimiento que interactúan extracelularmente con receptores de membrana plasmática, activando una cascada de señalización intracelular mediada por proteínas de la familia SMAD, las cuales activan en última instancia la transcripción en el núcleo de los genes diana (Nickel y Mueller, 2019). Mutaciones en los genes que codifican para algunos de estos factores de crecimiento como por ejemplo *msx2* and *foxn1*, han resultado en la hiperplasia del lecho ungueal o en láminas ungueales quebradizas y frágiles, demostrando su participación en el proceso normal de diferenciación de los onicocitos (Cai y Ma, 2011).

Con respecto a la tasa de crecimiento de la lámina ungueal, se ha demostrado que las uñas de las manos crecen más rápidamente que las de los pies (Pfister y Heneka, 1965), aunque esta tasa de crecimiento es muy variable en la población, pues existen numerosos factores con influencia. En este sentido, el crecimiento de las láminas ungueales de las manos difiere en función del dígito evaluado, de forma que, la lámina del tercer dígito es la que crece más rápidamente, y las láminas de primer y quinto dígito las que menos (Dawber, R., 1970). También influye la dominancia del miembro, pues el crecimiento es más rápido en los miembros dominantes (Hamilton *et al.*, 1955), todo ello muestra de la importancia de los mecanismos de control homeostático del crecimiento en función del desgaste producido. El grosor de las láminas ungueales también es una variable que depende del dígito en el que se evalúa, pero en este caso el patrón coincide de mayor a menor grosor, con la designación anatómica de los dígitos: primero>segundo>tercero>cuarto>quinto (Finlay *et al.*, 1987).

Otros factores que influyen incrementando la velocidad de crecimiento son: la juventud (Orentreich *et al.*, 1979), el género masculino (Hamilton *et al.*, 1955), el embarazo (Hewitt y Hillman, 1966), el estado nutricional óptimo (Gilchrist, 1939) y algunas patologías ungueales, como la onicolisis (Dawber, R. P. *et al.*, 1971) y sistémicas como la psoriasis (Dawber, R., 1970) o el hipertiroidismo (Dawber, R. y Baran, 1987).

Inmunología del aparato ungueal

Debido a su localización y función, el aparato ungueal está continuamente expuesto a posibles agresiones procedentes del medioambiente externo, por lo que

requiere de un buen funcionamiento de la respuesta inmune para combatir infecciones y daños tisulares. Al mismo tiempo, es necesario evitar respuestas inmunitarias exacerbadas que pongan en riesgo la integridad de estas estructuras fundamentales (Ito *et al.*, 2008). Junto con el folículo piloso, la matriz ungueal se considera uno de los compartimentos anatómicos protegidos de la actividad inflamatoria excesiva, gracias al privilegio inmunitario generado y mantenido por factores tisulares clave en estos microambientes inmunosupresores (Streilein, 1993).

La principal respuesta inmunitaria del aparato ungueal es la respuesta inmune innata, al tratarse de anejos cutáneos de origen epidérmico (García-Romero y Arenas, 2015), especialmente en la lámina ungueal, donde la respuesta específica es inexistente (Kaya *et al.*, 2009). El sistema inmunitario normal del aparato ungueal se caracteriza por un bajo nivel de expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) tipo I (HLA A, B y C) en los queratinocitos y melanocitos de la matriz ungueal, mientras que la expresión del HLA G está incrementada. Visto que el HLA G de tipo I no clásico, se relaciona con los fenómenos de desarrollo de tolerancia inmunológica entre la madre y el feto (Rouas-Freiss *et al.*, 1997), parece que este perfil de CMH tipo I protege al aparato ungueal de las reacciones inmunitarias excesivas. Adicionalmente, los niveles de expresión del CMH tipo II también están disminuidos en las células de la matriz ungueal, reduciendo la capacidad de presentación antigénica de esta estructura. Este patrón del CMH junto con la expresión del factor inhibidor de la migración de macrófagos limita la acción de las células Natural Killer (NK) en la matriz ungueal, actrices principales de la respuesta inmunitaria inespecífica. Este tipo celular no es el único implicado en la respuesta inespecífica que está escasamente representado en la matriz ungueal, el número de mastocitos también es reducido (Harries *et al.*, 2013). Sin embargo, se han identificado numerosos factores inmunosupresores en la matriz ungueal, cuya función es primordial para el mantenimiento de un ambiente inmunosupresor (Ito *et al.*, 2005).

Alteraciones en la integridad del sistema inmunitario del aparato ungueal causadas por infecciones fúngicas o por enfermedades autoinmunes como el liquen plano pilar conllevan el desarrollo de enfermedades ungueales como la onicomicosis (Kaya *et al.*, 2009) o incluso, la pérdida total de las láminas ungueales (Weston y Payette,

2015) respectivamente, poniendo de manifiesto la importancia de mantener el privilegio inmunitario de la matriz ungueal para garantizar el correcto mantenimiento de la homeostasis ungueal.

Filamentos intermedios

La mayoría de las células eucariotas presentan en su citoplasma un citoesqueleto más o menos desarrollado, en el que participan tres tipos de filamentos proteicos: filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios (FI). Los FI adquieren su nombre debido a que su diámetro (10-12nm) está comprendido entre el diámetro de los filamentos de actina (7-10nm) y el de los microtúbulos (25nm). Estos FI también están presentes en el núcleo donde forman un sistema independiente del citoplasmático (Rohde *et al.*, 1979; Timpl *et al.*, 1979). En humanos, los FI se clasifican dentro de una de las familias génicas más grandes (Hesse *et al.*, 2001), identificándose en torno a 70 genes diferentes (Szeverenyi *et al.*, 2008), lo que da una idea de la relevancia de estos filamentos en la estructura y función celular.

a) Estructura de los FI

Todas las proteínas formadoras de FI comparten una estructura primaria similar: un dominio de cabeza, un dominio central y un dominio de cola (Geisler y Weber, 1982; Herrmann *et al.*, 1996). Mientras que los dominios de cabeza y de cola son más variables en longitud y composición aminoacídica, y adquieren una estructura tridimensional globular, el dominio central está conservado y adquiere una estructura secundaria característica en hélice alfa a derechas, (Parry *et al.*, 1985) basada en la repetición de secuencias de 7 aminoácidos mayoritariamente hidrofóbicos y mantenida por puentes de hidrógeno (Conway y Parry, 1990). En concreto, son cuatro los subdominios presentes en el dominio central que adquieren conformación en hélice alfa (1A, 1B, 2A y 2B) y se encuentran separados por tres regiones de unión (L1, L1/2 y L3), que no adquieren esta estructura secundaria (Steinert, Steven, *et al.*, 1985). Esta estructura en hélice alfa altamente hidrofóbica del dominio central permite la asociación lateral de dos monómeros para formar dímeros orientados paralelamente (Geisler y Weber, 1982; Parry *et al.*, 1985), que adquieren una disposición de hélice superenrollada a izquierdas (Crick, 1952). En los FI estos dímeros pueden ser homopolímeros o heteropolímeros,

dependiendo del tipo de FI (Steinert *et al.*, 1981; Eichner *et al.*, 1986; Hatzfeld y Weber, 1990; Cui *et al.*, 1995) (Figura 5).

En una fase posterior de ensamblaje, dos dímeros se asocian lateralmente de forma antiparalela para generar un tetrámero apolar (Geisler *et al.*, 1985), que es la subunidad menor de los FI observable en las células, y la estructura que aporta más estabilidad al FI (Hatzfeld y Weber, 1990). Los tetrámeros se asocian en estructuras de orden superior: octámeros (como resultado de la asociación de dos tetrámeros) y unidades de longitud del filamento (ULF) (normalmente, resultado de la asociación de 8 tetrámeros). Estas ULF se alinean longitudinalmente para formar filamentos apolares que, durante la última fase de ensamblaje, adquieren su diámetro final mediante un proceso de compactación radial (Robert *et al.*, 2016). Tanto el proceso de ensamblaje de los FI como el de remodelación está mediado por la acción de diversas proteínas: entre las que se encuentran quinasas, fosfatasa chaperonas y proteínas de choque térmico (HSP) (Herrmann *et al.*, 2007) (Figura 5).

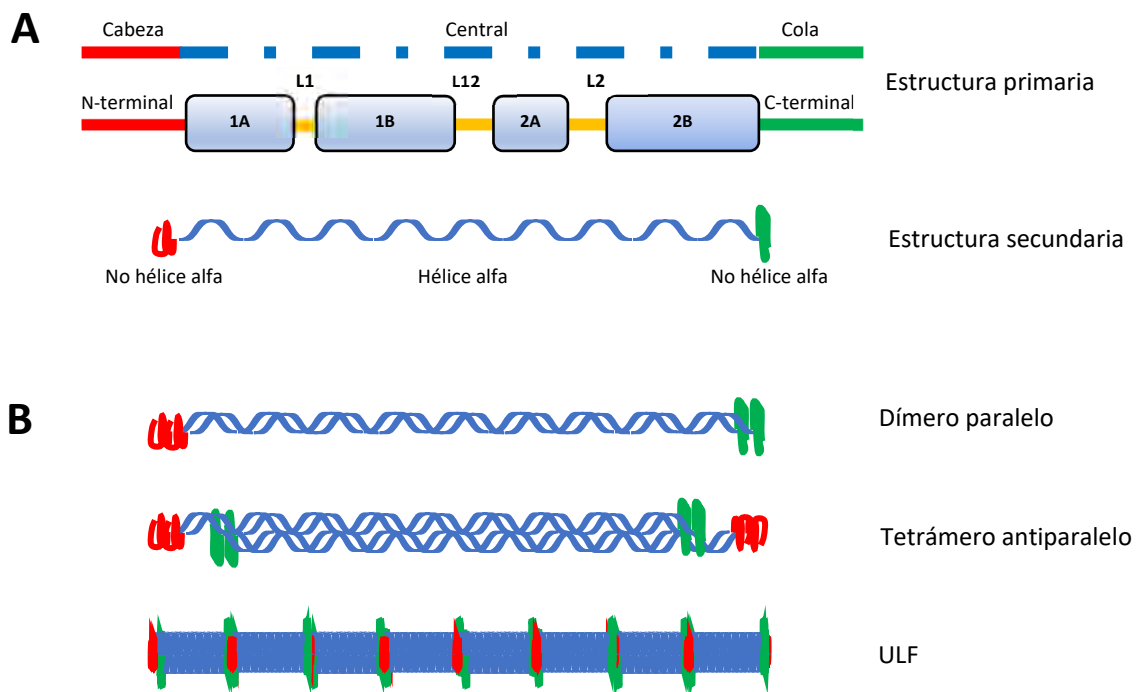


Figura 5. Ilustración esquemática de la estructura y ensamblaje general de homopolímeros de FI. A: estructura primaria y secundaria de las proteínas formadoras de los FI. B: proceso de ensamblaje de los FI. Dos monómeros se asocian paralelamente para formar un dímero. Dos dímeros se asocian antiparalelamente para formar un tetrámero. La asociación de tetrámeros resulta en la aparición de niveles de organización superiores. C: carboxilo, N: amino, L: secuencias espaciadoras, ULF: unidad de longitud del filamento.

A diferencia de lo que ocurre *in vitro* donde las proteínas formadoras de los FI se autoensamblan en ausencia de cofactores o aportes de energía (Steinert *et al.*, 1976), en la célula *in vivo* coexisten diferentes moléculas con distintos niveles de organización, de lo que se deduce que los FI están sometidos a un proceso continuo y regulado de remodelación (Robert *et al.*, 2016). Esta observación prueba que los FI participan en otros muchos procesos celulares como la adhesión, migración e invasión (Hendrix *et al.*, 1996) además de desempeñar un papel fundamental en la mecánica celular. Probablemente se requieran determinadas formas oligoméricas específicas de los IF para regular estas otras funciones, siendo el equilibrio de sus poblaciones un factor a considerar en su regulación (Robert *et al.*, 2016).

b) Clasificación de los FI

Los FI se clasifican en 6 tipos en función de la homología de secuencia del dominio intermedio (Parry y Steinert, 1992; Robert *et al.*, 2016; Sanghvi-Shah y Weber, 2017) (Tabla 1). Según esta clasificación, las proteínas del tipo I son las queratinas ácidas y las del tipo II son las queratinas básicas y neutras (Langbein *et al.*, 1999), ambas presentes en los tejidos epiteliales y en los anejos cutáneos. La clase tipo III incluye proteínas como la vimentina, la desmina, la periferina y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), localizadas principalmente en células mesenquimáticas, musculares, neuronas y células gliales (Hol y Capetanaki, 2017), en las que forman una red que se extiende desde la periferia del núcleo hasta la membrana citoplasmática, interactuando con otros filamentos citoplasmáticos (Serres *et al.*, 2020). Las proteínas del tipo IV incluyen las proteínas nestina, sinemina y neurofilamentos, y se localizan en distintos tejidos, siendo especialmente abundantes en células del tejido nervioso (Fliegner y Liem, 1991). La clase tipo V incluye las láminas, que son proteínas de localización nuclear que conforman la lámina nuclear, una capa filamentosa en contacto estrecho con la membrana nuclear interna (Fawcett, 1966). Por último, la clase VI también denominada huérfana incluye proteínas como la filesina o la faquinina específicas de células del cristalino en las que parecen desarrollar un papel fundamental en el mantenimiento de la transparencia de esta estructura (Oka *et al.*, 2008).

Tabla 1. Clasificación de los FI y principales localizaciones.

TIPO	PROTEINA	DISTRIBUCIÓN
I	Queratina ácida	Células epiteliales
II	Queratinas básicas y neutras	Células epiteliales
III	Vimentina, desmina, periferina, GFAP	Células mesenquimáticas, fibras musculares esqueléticas, cardíacas y lisas, y neuronas, células gliales y astrocitos
IV	Neurofilamentos, sinemina, nestina, internexina, sincoilina	Neuronas, astrocitos, músculos y células endoteliales
V	Láminas	Ubicuas (núcleos)
VI o huérfano	Filesina, Faquinina	Células del cristalino

GFAP: proteína ácida fibrilar glial.

La diversidad de los FI existente reside en varios aspectos, empezando por la diversidad de proteínas formadoras de FI, la posibilidad de asociarse para generar homopolímeros y/o heteropolímeros (Steinert *et al.*, 1981; Eichner *et al.*, 1986; Hatzfeld y Weber, 1990; Cui *et al.*, 1995) o la expresión diferencial de cada tipo de FI, de manera que cada tipo celular tiene su propio patrón característico de FI (Moll, R. *et al.*, 2008). Esta extraordinaria heterogeneidad combinada con las modificaciones postraduccionales adicionales de los FI (Snider y Omary, 2014) permite que las células ajusten sus propiedades mecánicas según el tejido y la etapa de desarrollo en la que se encuentran (Robert *et al.*, 2016).

Filamentos de queratina

Las queratinas conforman el grupo más amplio dentro de los FI y en el que más tempranamente se iniciaron los trabajos de investigación, adelantándose las primeras publicaciones sobre queratinas 15 años, en comparación con las del resto de los FI (Oshima, 2007). Considerando la gran diversidad de las queratinas y su amplia distribución celular, el desempeño de sus funciones se vislumbra igual de diverso y esencial. La más conocida de las funciones de las queratinas reside en el complejo andamiaje proteico que desarrollan, que define la arquitectura celular (Tao *et al.*, 2009) e interviene en el ciclo celular, especialmente durante la mitosis (Lane *et al.*, 1982). Este

andamiaje también es el responsable de dotar a las células y los tejidos epiteliales de resistencia frente al estrés mecánico, manteniendo su integridad estructural (Eichner *et al.*, 1986). Sin embargo, existen otras muchas funciones de las queratinas que no están relacionadas con sus propiedades mecánicas. En este sentido, se ha demostrado que las queratinas están también implicadas en procesos de señalización (Paramio y Jorcano, 2002), transporte (Toivola *et al.*, 2004), diferenciación celular (Vaidya y Kanojia, 2007), apoptosis (Ku *et al.*, 2016) y cicatrización de heridas (Batzer *et al.*, 2016). Todo ello, indicativo de la importancia clave de estos FI para el correcto desarrollo y funcionamiento celular y tisular.

A pesar de que todas las proteínas formadoras de FI comparten un patrón general (Figura 5), se han identificado algunas diferencias notables que caracterizan a las queratinas. A nivel genético, las queratinas están codificadas por una familia génica muy amplia, que comprende 54 genes funcionales y varios pseudogenes (Hesse *et al.*, 2001; Schweizer *et al.*, 2006). Existe una clara organización genética en dos clusters, las del tipo I localizadas en el cromosoma 17, excepto la K18 que siendo una queratina ácida se localiza junto a las queratinas del tipo II en el cluster del cromosoma 12 (Hesse *et al.*, 2001; Hesse *et al.*, 2004; Schweizer *et al.*, 2006). Esta disposición organizada de los genes no se observa en otras proteínas formadoras de FI con localizaciones genómicas mucho más dispersas (Hesse *et al.*, 2001). También se han descrito diferencias en la cantidad de intrones y exones, ya que las queratinas de tipo I se caracterizan por tener 7 intrones y 8 exones, mientras que las queratinas tipo II contienen 8 intrones y 9 exones (Smith, 2003). La localización de los intrones está conservada y se limita al dominio central y, testimonialmente, al dominio de cola (Steinert, Steven, *et al.*, 1985) (Figura 6).

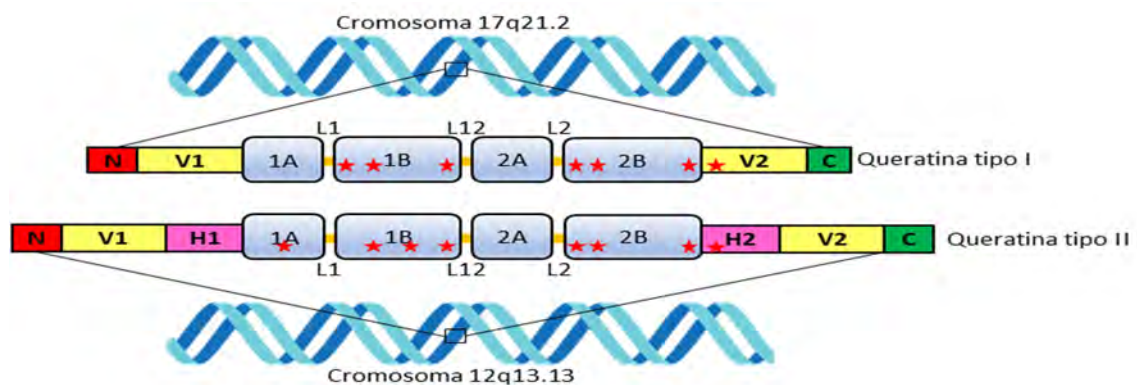


Figura 6. Ilustración esquemática de la estructura proteica básica de las queratinas. Estrellas: intrones.

Gracias a los estudios de homología de secuencia, en los dominios de cabeza y cola de las queratinas se han podido identificar hasta tres subdominios denominados: E (final, en los extremos amino y carboxilo), V (variable) y H (homólogo) (Rogers *et al.*, 2006), organizados de forma simétrica en torno al dominio central (Steinert, Parry, *et al.*, 1985). Atendiendo a estos subdominios, las queratinas del tipo I se diferencian de las del tipo II en que carecen de los subdominios H, tanto en el dominio de cabeza (H1) como en el de la cola (H2), mientras que los subdominios V1 (en el dominio de cabeza) y V2 (en el dominio de cola) sí están presentes en todas las queratinas, aunque con diferencias tanto en su secuencia aminoacídica como en su longitud. En general, se trata de subdominios constituidos por repeticiones de aminoácidos ricos en glicina, serina y aminoácidos apolares, cuya longitud varía desde las queratinas pequeñas que carecen de este subdominio hasta las queratinas de mayor tamaño que cuentan con hasta 130 aminoácidos (Steinert, Steven, *et al.*, 1985). Las secuencias de los subdominios V1 y V2 de las queratinas del tipo I y tipo II que conforman heterodímeros son similares, lo que permite mantener unas características fisicoquímicas concretas de los distintos filamentos de queratina, y adecuadas al tejido en el que se van a expresar (Steinert, Parry, *et al.*, 1985). Además, los subdominios localizados en los extremos de las queratinas de pelo se diferencian de los de las queratinas epiteliales por tener un alto contenido en cisteínas y prolinas, dotando a estos extremos de flexibilidad y capacidad de establecer puentes disulfuro con las cisteínas de las proteínas de la matriz que rodea a estos FI. Con todo, la estructura final adquiere mayor rigidez (Steinert, Jones, *et al.*, 1984) adaptándose a las necesidades del tejido. Por último y dentro de los dominios terminales, los subdominios amino y carboxilo de ambas queratinas se caracterizan por tener un alto contenido en aminoácidos básicos, con una longitud que oscila entre los 15 y 30 residuos (Steinert, Steven, *et al.*, 1985).

Con respecto al dominio central, la secuencia de 7 aminoácidos repetida en tándem normalmente contiene aminoácidos apolares en las posiciones primera y cuarta, y aminoácidos con carga en las posiciones quinta y séptima, lo que ayuda en el mantenimiento de la estructura en hélice alfa (Steinmetz *et al.*, 1998), mediante puentes de hidrógeno (Conway y Parry, 1990). Todos los subdominios de las queratinas del tipo

I son ácidos, mientras que sólo los subdominios 1B y 2A de las queratinas de tipo II son ácidos, el 2B no tiene carga y el 1A es básico (Steinert, Parry, *et al.*, 1984).

En lo referente a la homología de secuencia entre las queratinas del tipo I y II entre sí, y en comparación con otras proteínas como desmina y vimentina, es sorprendentemente reducida en torno al 30% (Hanukoglu y Fuchs, 1982), en parte debido a variaciones en el número de repeticiones de la heptada y a la distribución de cargas en la secuencia aminoacídica (Steinert, Parry, *et al.*, 1984). Con respecto a su organización, a diferencia de otros FI como los del tipo III, los filamentos de queratina siempre son heteropolímeros y presentan una clara estequiometría, con igual proporción de queratinas de tipo I que de tipo II (1:1) (Eichner *et al.*, 1986; Hatzfeld y Weber, 1990; Miller *et al.*, 1993). El ensamblaje del heterodímero se realiza de forma paralela, de manera que los dos dominios de cabeza de los dos monómeros se disponen en el mismo sentido (Parry *et al.*, 1985), si bien en niveles de ensamblaje superiores se dan de forma antiparalela (Steinert, 1991).

Finalmente, las modificaciones postraduccionales de las queratinas, además de incrementar la diversidad de esta familia de proteínas e intervenir en procesos de regulación y ensamblaje (Jacob *et al.*, 2018), están íntimamente relacionadas con el correcto desempeño de sus diversas funciones (Snider y Omary, 2014). Por ejemplo, las fosforilaciones y desfosforilaciones afectan al equilibrio entre las queratinas solubles y las queratinas agregadas (Strnad, P. *et al.*, 2002), siendo una de las modificaciones postraduccionales de las queratinas más frecuente. La mayoría de las modificaciones postraduccionales producidas en los monómeros de queratinas se producen en residuos de serina, treonina o arginina de los dominios de cabeza o cola (Jang *et al.*, 2019), especialmente fosforilaciones (Omary *et al.*, 2006), glicosilaciones (Ku *et al.*, 2010) y metilaciones (Jang *et al.*, 2019). Sin embargo, las acetilaciones (Snider *et al.*, 2013) y sumoilaciones o adiciones de pequeñas proteínas denominadas SUMO (del inglés modificadores pequeños relacionados con la ubiquitina) (Snider *et al.*, 2011) se producen mayoritariamente, en residuos de lisina del dominio intermedio.

a) *Ciclo de los filamentos de queratina*

Al igual que el resto de los FI, los filamentos de queratina también están sometidos a un ciclo constante de polimerización y despolimerización regulado de forma espacio temporal, pues se ha podido evaluar las tasas de ensamblaje y desensamblaje en determinadas regiones subcelulares (Moch *et al.*, 2013).

El modelo general para el ciclo de los filamentos de queratina propone que las primeras fases del ensamblaje ocurren fundamentalmente en la periferia celular, en regiones próximas a sitios de adhesión focal. Conforme se adquieren niveles superiores de ensamblaje se produce un transporte centrípeto mediado por filamentos de actina. En la región perinuclear, los filamentos de queratina bien sufren un proceso de maduración (Lee *et al.*, 2012) o bien inician el desensamblaje, liberando oligómeros solubles que difunden por el citoplasma hasta alcanzar de nuevo la periferia celular donde se inicia de nuevo el ciclo (Windoffer *et al.*, 2011).

En el caso de los epitelios estratificados queratinizados como es el caso de la lámina ungueal, el ciclo de los filamentos de queratina se desplaza hacia la polimerización, generando una compleja estructura proteica biológicamente inactiva (Eckhart *et al.*, 2013).

b) Patrones de expresión de los filamentos de queratina

Todos los tejidos epiteliales se caracterizan por mostrar un patrón de expresión de queratinas característico (Moll, I. *et al.*, 1988). Además, este patrón puede variar en función del estado de diferenciación en el que se encuentre el tejido. De forma que, en un epitelio en estadios tempranos de diferenciación, se expresan inicialmente filamentos de queratina formados por una pareja concreta de monómeros de queratina denominados queratinas primarias, cuya expresión puede mantenerse o ser sustituida a lo largo del proceso de diferenciación epitelial por otro par distinto de monómeros de queratina, denominados en este caso, queratinas secundarias (Owens y Lane, 2003). A modo de ejemplo, el heteropolímero de queratina K8/K18 es el par de queratinas primarias expresadas en las células de los epitelios simples (Moll, R. *et al.*, 1982), siendo el ejemplo clásico de las únicas queratinas presentes en los hepatocitos (Ku *et al.*, 2007). Sin embargo, en otros epitelios simples el par de queratinas primarias K8/K18 es expresado junto con otras queratinas secundarias (Karantza, 2011) como el

heteropolímero K7/K19, considerado como las queratinas secundarias de los epitelios simples, localizadas en las células propias de los ductos biliares y hepáticos (Moll, R. *et al.*, 2008), entre otras muchas localizaciones.

Otros heteropolímeros de queratinas característicos de epitelios concretos son: el par K5/K14 considerado como las queratinas primarias de los epitelios estratificados (Nelson y Sun, 1983), especialmente expresados en las células basales del epitelio, menos diferenciadas (Moll, R. *et al.*, 2008); el par K6/K16 considerado como las queratinas secundarias de los epitelios estratificados y característico de queratinocitos hiperproliferativos (Machesney *et al.*, 1998), que se ha identificado en piel glabra, en el folículo piloso y en el aparato (Perrin, 2007); el par K1/K10 considerado marcador del proceso de queratinización epidérmico (Stoler *et al.*, 1988); el par K3/K13 característico del epitelio corneal (Kao, 2020) y el par K4/K13 propio de los epitelios estratificados mucosos (Langbein *et al.*, 2016), etc.

El empleo de las queratinas como marcadores en el diagnóstico tumoral, evolución y pronóstico, ha sido ampliamente investigado (Moll, R. *et al.*, 2008; Karantza, 2011; Ku *et al.*, 2016) debido fundamentalmente, a la especificidad de la expresión de las queratinas en función del tejido y de su estado de diferenciación, unido al hecho de que los tumores epiteliales mantienen ampliamente el patrón de expresión característico del tipo celular del que derivan.

Consistencia ungueal

De forma intuitiva, al pensar en la consistencia de las sustancias evocamos la forma en la que las partículas de las sustancias se unen entre sí, e incluso la solemos relacionar con estabilidad o solidez. Es por eso por lo que este término se ha empleado en la bibliografía clínica para describir las uñas quebradizas (Shemer y Daniel, 2013), un síndrome que afecta al 20-30% de la población, especialmente a las mujeres (Lubach *et al.*, 1986; Gequelim *et al.*, 2013). Se caracteriza fundamentalmente por la fragilidad de las láminas ungueales (Iorizzo *et al.*, 2004; van de Kerkhof *et al.*, 2005) y se manifiesta con onicorrexis (presencia de surcos o fisuras longitudinales) y onicosquicia (separación de las capas que componen la lámina en el borde libre) (Zaiac y Walker, 2013).

Durante las exploraciones podológicas, los profesionales evalúan entre otros aspectos, posibles cambios en el color, la forma o el grosor de las láminas ungueales debido a que son importantes signos indicativos de posibles patologías ungueales y/o sistémicas (Shemer y Daniel, 2013; Zaiac y Walker, 2013; Baraldi *et al.*, 2015). Por tanto, detectar precozmente estos cambios repercute directamente en el diagnóstico temprano, en la prescripción de tratamientos preventivos y en la derivación a otros profesionales especialistas de la salud, con lo que se incide en la fase preventiva de la atención sanitaria.

Como consecuencia de la práctica podológica rutinaria y con el objetivo de evaluar más integralmente el estado de salud de los aparatos ungueales durante las exploraciones, nació el término consistencia ungueal en el seno de nuestro grupo de investigación. Los primeros trabajos en los que se consideró la consistencia ungueal permitieron establecer una metodología para su determinación cualitativa (Pérez Pico *et al.*, 2017). El método empleado requiere, por tanto, de profesionales entrenados y consiste básicamente, en la aplicación de presión manual sobre los bordes del aparato ungueal tanto en el eje dorso-ventral como en el eje lateral-medial, valorando conjuntamente el comportamiento de la lámina bajo presión y el cambio de color del lecho ungueal asociado al cese transitorio del riego sanguíneo (Figura 7).

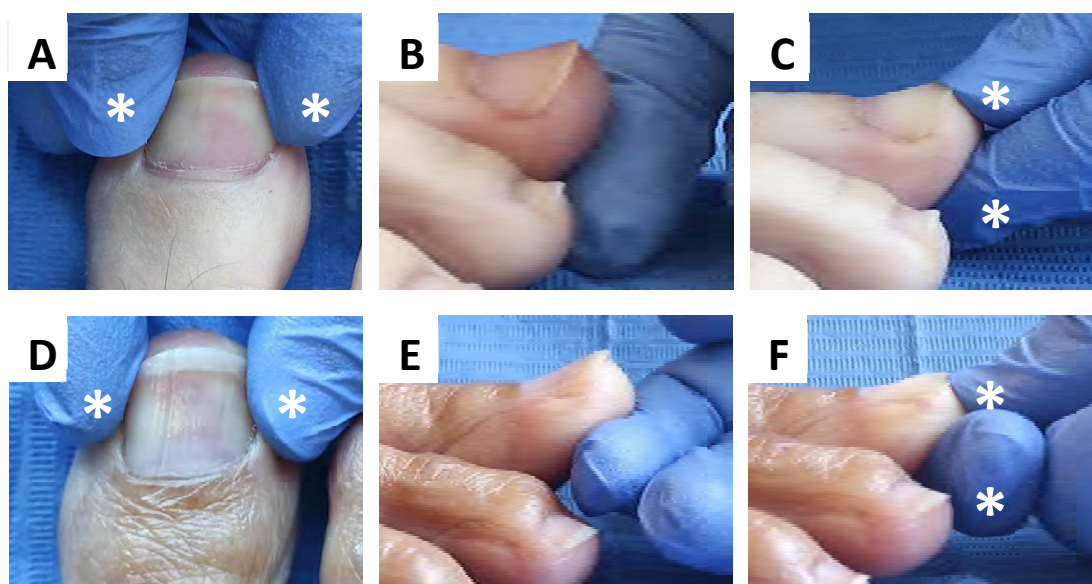


Figura 7. Determinación de la consistencia ungueal ejerciendo presión manual. A-C: uña de consistencia dura, D-F: uñas de consistencia blanda, A: presión lateral-medial, B: visión lateral sin presión, C: visión lateral bajo presión dorso-ventral, D: presión lateral-medial, E: visión lateral sin presión, F: visión lateral bajo presión dorso-ventral.

Atendiendo a esta metodología, tres tipos de consistencias ungueales diferentes se han identificado: uñas de consistencia dura, uñas de consistencia media y uñas de consistencia blanda. Además, se ha descrito que las frecuencias de cada tipo de consistencia ungueal varían en función de la edad, el género y la práctica de actividad deportiva (Pérez Pico *et al.*, 2017; Pérez Pico *et al.*, 2019). Así, en muestras de jóvenes (edad media=21 años) las uñas de consistencia media son las más frecuentes frente a las uñas de consistencia blanda, que son las que muestran menores frecuencias. En cuanto a la práctica deportiva, se ha demostrado que las uñas de consistencia dura son más frecuentes entre aquellos jóvenes que desarrollan actividad deportiva (Pérez Pico *et al.*, 2017). Sin embargo, en muestras de hombres adultos (edad media=49 años) la consistencia ungueal más frecuente es la dura, mientras que en mujeres más jóvenes (edad media=36 años) las uñas de consistencia media fueron las más frecuentes (Pérez Pico *et al.*, 2019), como cabría esperar atendiendo a lo publicado previamente (Pérez Pico *et al.*, 2017).

A la vista de lo expuesto, se planteó la necesidad de analizar las bases elementales y moleculares que sustentarían los diferentes tipos de consistencias ungueales observados en las muestras analizadas hasta la fecha, así como la posibilidad de desarrollar modelos predictivos de la consistencia ungueal basados en las principales variables que la determinan. Paralelamente, se hace vital el desarrollo de una metodología alternativa, más objetiva y cuantificable que permita estudiar más profundamente la consistencia ungueal.

Por tanto, el presente trabajo de tesis se estructura en 3 capítulos: el primero dedicado al análisis de las bases elementales que determinan la consistencia ungueal, el segundo centrado en el análisis de las bases moleculares que la sustentan y el tercero sobre el desarrollo de un método cuantitativo para su determinación.

Con todo, se obtendría una información muy valiosa y más completa sobre la consistencia ungueal, así como de la importancia de su estudio durante las exploraciones podológicas, como uno de los principales signos que deben ser considerados al explorar el aparato ungueal junto a la forma, el color u otras características evaluadas en la lámina ungueal. Las potenciales aplicaciones clínicas de la determinación de la consistencia ungueal como signo indicativo de otras patologías

ungueales o sistémicas están todavía por analizar, si bien sirva este trabajo como un primer paso necesario en el estudio de la consistencia ungueal bajo condiciones de salud, antes de poder analizar su posible relación con los estados patológicos más prevalentes en la población actual, para obtener mejores terapias y lo más efectivas posibles.

BIBLIOGRAFÍA

- Achten, G. y Parent, D. (1983). The normal and pathologic nail. *Int J Dermatol*, 22(10), 556-565. doi:<http://doi.org/10.1111/j.1365-4362.1983.tb02124.x>
- Andre, J., Sass, U., Richert, B. y Theunis, A. (2013). Nail pathology. *Clin Dermatol*, 31(5), 526-539. doi:<http://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.06.005>
- Baden, H. P. (1970). The physical properties of nail. *J Invest Dermatol*, 55(2), 115-122. doi:<http://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12291628>
- Baden, H. P. y Kvedar, J. C. (1993). Epithelial cornified envelope precursors are in the hair follicle and nail. *J Invest Dermatol*, 101(1 Suppl), 72S-74S. doi:[https://doi.org/10.1016/0022-202X\(93\)90504-B](https://doi.org/10.1016/0022-202X(93)90504-B)
- Baraldi, A., Jones, S. A., Guesne, S., Traynor, M. J., McAuley, W. J., Brown, M. B. y Murdan, S. (2015). Human nail plate modifications induced by onychomycosis: implications for topical therapy. *Pharm Res*, 32(5), 1626-1633. doi:<https://doi.org/10.1007/s11095-014-1562-5>
- Batzer, A. T., Marsh, C. y Kirsner, R. S. (2016). The use of keratin-based wound products on refractory wounds. *Int Wound J*, 13(1), 110-115. doi:<http://doi.org/10.1111/iwj.12245>
- Belyayeva, E., Gregoriou, S., Chalikias, J., Kontochristopoulos, G., Koumantaki, E., Makris, M., Koti, I., Katoulis, A., Katsambas, A. y Rigopoulos, D. (2013). The impact of nail disorders on quality of life. *Eur J Dermatol*, 23(3), 366-371. doi:<http://doi.org/10.1684/ejd.2013.2048>
- Blaydon, D. C., Ishii, Y., O'Toole, E. A., Unsworth, H. C., Teh, M. T., Ruschendorf, F., Sinclair, C., Hopsu-Havu, V. K., Tidman, N., Moss, C., Watson, R., de Berker, D., Wajid, M., Christiano, A. M. y Kelsell, D. P. (2006). The gene encoding R-spondin 4 (RSPO4), a secreted protein implicated in Wnt signaling, is mutated in inherited anonychia. *Nat Genet*, 38(11), 1245-1247. doi:<http://doi.org/10.1038/ng1883>
- Bray, S. J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(9), 678-689. doi:<http://doi.org/10.1038/nrm2009>
- Cai, J. y Ma, L. (2011). Msx2 and Foxn1 regulate nail homeostasis. *Genesis*, 49(6), 449-459. doi:<http://doi.org/10.1002/dvg.20744>
- Caputo, R., Gasparini, G. y Contini, D. (1982). A freeze-fracture study of the human nail plate. *Arch Dermatol Res*, 272(1-2), 117-125. doi:<https://doi.org/10.1007/bf00510401>
- Conway, J. F. y Parry, D. A. (1990). Structural features in the heptad substructure and longer range repeats of two-stranded alpha-fibrous proteins. *Int J Biol Macromol*, 12(5), 328-334. doi:[http://doi.org/10.1016/0141-8130\(90\)90023-4](http://doi.org/10.1016/0141-8130(90)90023-4)
- Crick, F. H. (1952). Is alpha-keratin a coiled coil? *Nature*, 170(4334), 882-883. doi:<http://doi.org/10.1038/170882b0>
- Cui, C., Stambrook, P. J. y Parysek, L. M. (1995). Peripherin assembles into homopolymers in SW13 cells. *J Cell Sci*, 108 (Pt 10), 3279-3284. doi:<https://doi.org/10.1242/jcs.108.10.3279>
- Dale, B. A., Resing, K. A. y Lonsdale-Eccles, J. D. (1985). Filaggrin: a keratin filament associated protein. *Ann N Y Acad Sci*, 455, 330-342. doi:<http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1985.tb50420.x>
- Dawber, R. (1970). Fingernail growth in normal and psoriatic subjects. *Br J Dermatol*, 82(5), 454-457. doi:<http://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1970.tb02205.x>
- Dawber, R. y Baran, R. (1987). Nail growth. *Cutis*, 39(2), 99-103.
- Dawber, R. P., Samman, P. D. y Bottoms, E. (1971). Fingernail growth in idiopathic and psoriatic onycholysis. *Br J Dermatol*, 85(6), 558-560. doi:<http://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1971.tb14082.x>
- de Berker, D. (2013). Nail anatomy. *Clin Dermatol*, 31(5), 509-515. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.06.006>

- de Berker, D. y Angus, B. (1996). Proliferative compartments in the normal nail unit. *Br J Dermatol*, 135(4), 555-559. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1996.d01-1039.x>
- de Berker, D., Graham, A., Dawber, R. y Thody, A. (1996). Melanocytes are absent from normal nail bed: the basis of a clinical dictum. *Br J Dermatol*, 134(3), 564.
- de Berker, D., Mawhinney, B. y Sviland, L. (1996). Quantification of regional matrix nail production. *Br J Dermatol*, 134(6), 1083-1086. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1996.d01-906.x>
- Demerjian, M., Hachem, J. P., Tschachler, E., Denecker, G., Declercq, W., Vandenaabeele, P., Mauro, T., Hupe, M., Crumrine, D., Roelandt, T., Houben, E., Elias, P. M. y Feingold, K. R. (2008). Acute modulations in permeability barrier function regulate epidermal cornification: role of caspase-14 and the protease-activated receptor type 2. *Am J Pathol*, 172(1), 86-97. doi:<http://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070161>
- Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E. y Declercq, W. (2013). Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta*, 1833(12), 3471-3480. doi:<http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.010>
- Eichner, R., Sun, T. T. y Aebi, U. (1986). The role of keratin subfamilies and keratin pairs in the formation of human epidermal intermediate filaments. *J Cell Biol*, 102(5), 1767-1777. doi:<http://doi.org/10.1083/jcb.102.5.1767>
- Farran, L., Ennos, A. R. y Eichhorn, S. J. (2008). The effect of humidity on the fracture properties of human fingernails. *J Exp Biol*, 211(Pt 23), 3677-3681. doi:<http://doi.org/10.1242/jeb.023218>
- Farren, L., Shayler, S. y Ennos, A. R. (2004). The fracture properties and mechanical design of human fingernails. *J Exp Biol*, 207(Pt 5), 735-741. doi:<https://doi.org/10.1242/jeb.00814>
- Fawcett, D. W. (1966). On the occurrence of a fibrous lamina on the inner aspect of the nuclear envelope in certain cells of vertebrates. *Am J Anat*, 119(1), 129-145. doi:<http://doi.org/10.1002/aja.1001190108>
- Finlay, A. Y., Moseley, H. y Duggan, T. C. (1987). Ultrasound transmission time: an in vivo guide to nail thickness. *Br J Dermatol*, 117(6), 765-770. doi:<http://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1987.tb07358.x>
- Fischer, H., Eckhart, L., Mildner, M., Jaeger, K., Buchberger, M., Ghannadan, M. y Tschachler, E. (2007). DNase1L2 degrades nuclear DNA during corneocyte formation. *J Invest Dermatol*, 127(1), 24-30. doi:<http://doi.org/10.1038/sj.jid.5700503>
- Fleckman, P. y Allan, C. (2001). Surgical anatomy of the nail unit. *Dermatol Surg*, 27(3), 257-260. doi:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11277893/>
- Fleckman, P., Jaeger, K., Silva, K. A. y Sundberg, J. P. (2013). Comparative anatomy of mouse and human nail units. *Anat Rec (Hoboken)*, 296(3), 521-532. doi:<https://doi.org/10.1002/ar.22660>
- Fliegner, K. H. y Liem, R. K. (1991). Cellular and molecular biology of neuronal intermediate filaments. *Int Rev Cytol*, 131, 109-167. doi:[http://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)62018-5](http://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)62018-5)
- García-Romero, M. T. y Arenas, R. (2015). New insights into genes, immunity, and the occurrence of dermatophytosis. *J Invest Dermatol*, 135(3), 655-657. doi:<http://doi.org/10.1038/jid.2014.498>
- Geisler, N., Kaufmann, E. y Weber, K. (1985). Antiparallel orientation of the two double-stranded coiled-coils in the tetrameric protofilament unit of intermediate filaments. *J Mol Biol*, 182(1), 173-177. doi:[http://doi.org/10.1016/0022-2836\(85\)90035-x](http://doi.org/10.1016/0022-2836(85)90035-x)
- Geisler, N. y Weber, K. (1982). The amino acid sequence of chicken muscle desmin provides a common structural model for intermediate filament proteins. *EMBO J*, 1(12), 1649-1656. doi:<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01368.x>
- Gequelim, G. C., Kubota, C. Y., Sanches, S., Dranka, D., Mejia, M. M., Sumiya, F. M. y Schmitt, J. V. (2013). Perception of brittle nails in dermatologic patients: a cross-sectional study. *An Bras Dermatol*, 88(6), 1022-1025. doi:<http://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20132327>

- Gilchrist, M. L.** (1939). The relation of finger-nail growth to nutritional status. *J Anat*, 73(Pt 4), 575-582.
- Hamilton, J. B., Terada, H. y Mestler, G. E.** (1955). Studies of growth throughout the lifespan in Japanese: growth and size of nails and their relationship to age, sex, heredity, and other factors. *J Gerontol*, 10(4), 401-415. doi:<http://doi.org/10.1093/geronj/10.4.401>
- Haneke, E.** (2006). Surgical anatomy of the nail apparatus. *Dermatol clin*, 24, 291-296. doi:<https://doi.org/10.1016/j.det.2006.03.007>
- Haneke, E.** (2015). Anatomy of the nail unit and the nail biopsy. *Semin Cutan Med Surg*, 34(2), 95-100. doi:<http://doi.org/10.12788/j.sder.2015.0143>
- Hanukoglu, I. y Fuchs, E.** (1982). The cDNA sequence of a human epidermal keratin: divergence of sequence but conservation of structure among intermediate filament proteins. *Cell*, 31(1), 243-252. doi:[http://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90424-x](http://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90424-x)
- Harries, M. J., Meyer, K., Chaudhry, I., J, E. K., Poblet, E., Griffiths, C. E. y Paus, R.** (2013). Lichen planopilaris is characterized by immune privilege collapse of the hair follicle's epithelial stem cell niche. *J Pathol*, 231(2), 236-247. doi:<http://doi.org/10.1002/path.4233>
- Hashimoto, K.** (1971). Ultrastructure of the human toenail. I. Proximal nail matrix. *J Invest Dermatol*, 56(3), 235-246. doi:<http://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12260883>
- Hatzfeld, M. y Weber, K.** (1990). The coiled coil of in vitro assembled keratin filaments is a heterodimer of type I and II keratins: use of site-specific mutagenesis and recombinant protein expression. *J Cell Biol*, 110(4), 1199-1210. doi:<http://doi.org/10.1083/jcb.110.4.1199>
- Hendrix, M. J., Seftor, E. A., Chu, Y. W., Trevor, K. T. y Seftor, R. E.** (1996). Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 15(4), 507-525. doi:<http://doi.org/10.1007/BF00054016>
- Herrmann, H., Bar, H., Kreplak, L., Strelkov, S. V. y Aebi, U.** (2007). Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(7), 562-573. doi:<http://doi.org/10.1038/nrm2197>
- Herrmann, H., Haner, M., Brettel, M., Muller, S. A., Goldie, K. N., Fedtke, B., Lustig, A., Franke, W. W. y Aebi, U.** (1996). Structure and assembly properties of the intermediate filament protein vimentin: the role of its head, rod and tail domains. *J Mol Biol*, 264(5), 933-953. doi:<http://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0688>
- Hesse, M., Magin, T. M. y Weber, K.** (2001). Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J Cell Sci*, 114(Pt 14), 2569-2575. doi:<https://doi.org/10.1242/jcs.114.14.2569>
- Hesse, M., Zimek, A., Weber, K. y Magin, T. M.** (2004). Comprehensive analysis of keratin gene clusters in humans and rodents. *Eur J Cell Biol*, 83(1), 19-26. doi:<http://doi.org/10.1078/0171-9335-00354>
- Hewitt, D. y Hillman, R. W.** (1966). Relation between rate of nail growth in pregnant women and estimated previous general growth rate. *Am J Clin Nutr*, 19(6), 436-439. doi:<http://doi.org/10.1093/ajcn/19.5.436>
- Hol, E. M. y Capetanaki, Y.** (2017). Type III Intermediate Filaments Desmin, Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Vimentin, and Peripherin. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9(12). doi:<http://doi.org/10.1101/cshperspect.a021642>
- Huelsken, J. y Behrens, J.** (2002). The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*, 115(21), 3977-3978. doi:<http://doi.org/10.1242/jcs.00089>
- Iorizzo, M., Pazzaglia, M., B, M. P., Tullo, S. y Tosti, A.** (2004). Brittle nails. *J Cosmet Dermatol*, 3(3), 138-144. doi:<http://doi.org/10.1111/j.1473-2130.2004.00084.x>
- Ito, T., Ito, N., Saathoff, M., Stampachiachiere, B., Bettermann, A., Bulfone-Paus, S., Takigawa, M., Nickoloff, B. J. y Paus, R.** (2005). Immunology of the human nail apparatus: the nail matrix is a site of relative immune privilege. *J Invest Dermatol*, 125(6), 1139-1148. doi:<http://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23927.x>

- Ito, T., Meyer, K. C., Ito, N. y Paus, R. (2008). Immune privilege and the skin. *Curr Dir Autoimmun*, 10, 27-52. doi:<http://doi.org/10.1159/000131412>
- Jacob, J. T., Coulombe, P. A., Kwan, R. y Omary, M. B. (2018). Types I and II Keratin Intermediate Filaments. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10(4). doi:<http://doi.org/10.1101/cshperspect.a018275>
- Jaeger, K., Sukserree, S., Zhong, S., Phinney, B. S., Mlitz, V., Buchberger, M., Narzt, M. S., Gruber, F., Tschachler, E., Rice, R. H. y Eckhart, L. (2019). Cornification of nail keratinocytes requires autophagy for bulk degradation of intracellular proteins while sparing components of the cytoskeleton. *Apoptosis*, 24(1-2), 62-73. doi:<http://doi.org/10.1007/s10495-018-1505-4>
- Jäger, K., Fischer, H., Tschachler, E. y Eckhart, L. (2007). Terminal differentiation of nail matrix keratinocytes involves up-regulation of DNase1L2 but is independent of caspase-14 expression. *Differentiation*, 75(10), 939-946. doi:<http://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2007.00183.x>
- Jang, K. H., Yoon, H. N., Lee, J., Yi, H., Park, S. Y., Lee, S. Y., Lim, Y., Lee, H. J., Cho, J. W., Paik, Y. K., Hancock, W. S. y Ku, N. O. (2019). Liver disease-associated keratin 8 and 18 mutations modulate keratin acetylation and methylation. *FASEB J*, 33(8), 9030-9043. doi:<http://doi.org/10.1096/fj.201800263RR>
- Jarrett, A. y Spearman, R. I. (1966). The histochemistry of the human nail. *Arch Dermatol*, 94(5), 652-657. doi:<http://doi.org/doi:10.1001/archderm.1966.01600290126024>
- Jeka, J. J. y Lackner, J. R. (1994). Fingertip contact influences human postural control. *Exp Brain Res*, 100(3), 495-502. doi:<http://doi.org/10.1007/BF02738408>
- Johnson, M., Comaish, J. S. y Shuster, S. (1991). Nail is produced by the normal nail bed: a controversy resolved. *Br J Dermatol*, 125(1), 27-29. doi:<http://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1991.tb06034.x>
- Kao, W. W. (2020). Keratin expression by corneal and limbal stem cells during development. *Exp Eye Res*, 200, 108206. doi:<http://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108206>
- Karantz, V. (2011). Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene*, 30(2), 127-138. doi:<http://doi.org/10.1038/onc.2010.456>
- Kaya, T. I., Eskandari, G., Guvenc, U., Gunes, G., Tursen, U., Burak Cimen, M. Y. y Ikizoglu, G. (2009). CD4+CD25+ Treg cells in patients with toenail onychomycosis. *Arch Dermatol Res*, 301(10), 725-729. doi:<http://doi.org/10.1007/s00403-009-0941-y>
- Kobayashi, Y., Miyamoto, M., Sugibayashi, K. y Morimoto, Y. (1999). Drug Permeation through the Three Layers of the Human Nail Plate. *J Pharm Pharmacol*, 51(3), 271-278. doi:<https://doi.org/10.1211/0022357991772448>
- Ku, N. O., Strnad, P., Bantel, H. y Omary, M. B. (2016). Keratins: Biomarkers and modulators of apoptotic and necrotic cell death in the liver. *Hepatology*, 64(3), 966-976. doi:<http://doi.org/10.1002/hep.28493>
- Ku, N. O., Strnad, P., Zhong, B. H., Tao, G. Z. y Omary, M. B. (2007). Keratins let liver live: Mutations predispose to liver disease and crosslinking generates Mallory-Denk bodies. *Hepatology*, 46(5), 1639-1649. doi:<http://doi.org/10.1002/hep.21976>
- Ku, N. O., Toivola, D. M., Strnad, P. y Omary, M. B. (2010). Cytoskeletal keratin glycosylation protects epithelial tissue from injury. *Nat Cell Biol*, 12(9), 876-885. doi:<http://doi.org/10.1038/ncb2091>
- Lane, E. B., Goodman, S. L. y Trejdosiewicz, L. K. (1982). Disruption of the keratin filament network during epithelial cell division. *EMBO J*, 1(11), 1365-1372.
- Langbein, L., Eckhart, L., Fischer, H., Rogers, M. A., Praetzel-Wunder, S., Parry, D. A., Kittstein, W. y Schweizer, J. (2016). Localisation of keratin K78 in the basal layer and first suprabasal layers of stratified epithelia completes expression catalogue of type II keratins and provides new insights into sequential keratin expression. *Cell Tissue Res*, 363(3), 735-750. doi:<http://doi.org/10.1007/s00441-015-2278-5>

- Langbein, L., Rogers, M. A., Winter, H., Praetzel, S., Beckhaus, U., Rackwitz, H. R. y Schweizer, J. (1999). The catalog of human hair keratins. I. Expression of the nine type I members in the hair follicle. *J Biol Chem*, 274(28), 19874-19884. doi:<http://doi.org/10.1074/jbc.274.28.19874>
- Lee, C. H., Kim, M. S., Chung, B. M., Leahy, D. J. y Coulombe, P. A. (2012). Structural basis for heteromeric assembly and perinuclear organization of keratin filaments. *Nat Struct Mol Biol*, 19(7), 707-715. doi:<http://doi.org/10.1038/nsmb.2330>
- Lewin, K. (1965). The normal finger nail. *Br J Dermatol*, 77(8), 421-430. doi:<http://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1965.tb14672.x>
- Lewis, B. L. (1954). Microscopic studies of fetal and mature nail and surrounding soft tissue. *AMA Arch Derm Syphilol*, 70(6), 733-747. doi:<http://doi.org/10.1001/archderm.1954.01540240038005>
- Lin, M. H. y Kopan, R. (2003). Long-range, nonautonomous effects of activated Notch1 on tissue homeostasis in the nail. *Dev Biol*, 263(2), 343-359. doi:<http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.07.007>
- Lubach, D., Cohrs, W. y Wurzinger, R. (1986). Incidence of brittle nails. *Dermatologica*, 172(3), 144-147. doi:<http://doi.org/10.1159/000249319>
- Machesney, M., Tidman, N., Waseem, A., Kirby, L. y Leigh, I. (1998). Activated keratinocytes in the epidermis of hypertrophic scars. *Am J Pathol*, 152(5), 1133-1141.
- Maricq, H. R. (1967). Observation and photography of sweat ducts of the finger in vivo. *J Invest Dermatol*, 48(4), 399-401. doi:<http://doi.org/10.1038/jid.1967.63>
- Martin, B. F. y Platts, M. M. (1959). A histological study of the nail region in normal human subjects and in those showing splinter haemorrhages of the nail. *J Anat*, 93, 323-330.
- Matoltsy, A. G. (1975). Desmosomes, filaments, and keratohyaline granules: their role in the stabilization and keratinization of the epidermis. *J Invest Dermatol*, 65(1), 127-142. doi:<http://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12598093>
- McCarthy, D. J. (2004). Anatomic considerations of the human nail. *Clin Podiatr Med Surg*, 21(4), 477-491. doi:<http://doi.org/10.1016/j.cpm.2004.05.004>
- Mecklenburg, L., Paus, R., Halata, Z., Bechtold, L. S., Fleckman, P. y Sundberg, J. P. (2004). FOXN1 is critical for onycholemmal terminal differentiation in nude (Foxn1) mice. *J Invest Dermatol*, 123(6), 1001-1011. doi:<http://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23442.x>
- Miller, R. K., Khuon, S. y Goldman, R. D. (1993). Dynamics of keratin assembly: exogenous type I keratin rapidly associates with type II keratin in vivo. *J Cell Biol*, 122(1), 123-135. doi:<http://doi.org/10.1083/jcb.122.1.123>
- Moch, M., Herberich, G., Aach, T., Leube, R. E. y Windoffer, R. (2013). Measuring the regulation of keratin filament network dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(26), 10664-10669. doi:<http://doi.org/10.1073/pnas.1306020110>
- Moll, I., Heid, H. W., Franke, W. W. y Moll, R. (1988). Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. III. Hair and nail formation during human fetal development. *Differentiation*, 39(3), 167-184. doi:<http://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1988.tb00092.x>
- Moll, R., Divo, M. y Langbein, L. (2008). The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*, 129(6), 705-733. doi:<http://doi.org/10.1007/s00418-008-0435-6>
- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. y Krepler, R. (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31(1), 11-24. doi:[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90400-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90400-7)
- Munteanu, O., Filipoiu, F. M., Cirstoiu, M. M., Baloiu, A. I., Petrescu, I. A. y Bohiltea, R. E. (2021). A Comprehensive Study Regarding the Intrauterine Development of Nails. *Organogenesis*, 17(1-2), 14-19. doi:<http://doi.org/10.1080/15476278.2021.1899739>
- Naz, G., Pasternack, S. M., Perrin, C., Mattheisen, M., Refke, M., Khan, S., Gul, A., Simons, M., Ahmad, W. y Betz, R. C. (2012). FZD6 encoding the Wnt receptor frizzled 6 is mutated

- in autosomal-recessive nail dysplasia. *Br J Dermatol*, 166(5), 1088-1094. doi:<http://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2011.10800.x>
- Nelson, W. G. y Sun, T. T.** (1983). The 50- and 58-kdalton keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia: cell culture studies. *J Cell Biol*, 97(1), 244-251. doi:<http://doi.org/10.1083/jcb.97.1.244>
- Nickel, J. y Mueller, T. D.** (2019). Specification of BMP signaling. *Cells*, 8(12), 1-29. doi:<http://doi.org/10.3390/cells8121579>
- Norton, L. A.** (1971). Incorporation of thymidine-methyl-H3 and glycine-2-H3 in the nail matrix and bed of humans. *J Invest Dermatol*, 56(1), 61-68. doi:<http://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12291905>
- Oka, M., Kudo, H., Sugama, N., Asami, Y. y Takehana, M.** (2008). The function of filensin and phakinin in lens transparency. *Mol Vis*, 14, 815-822.
- Omary, M. B., Ku, N. O., Tao, G. Z., Toivola, D. M. y Liao, J.** (2006). "Heads and tails" of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends Biochem Sci*, 31(7), 383-394. doi:<http://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.05.008>
- Orentreich, N., Markofsky, J. y Vogelmann, J. H.** (1979). The effect of aging on the rate of linear nail growth. *J Invest Dermatol*, 73(1), 126-130. doi:<http://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12532799>
- Oshima, R. G.** (2007). Intermediate filaments: a historical perspective. *Exp Cell Res*, 313(10), 1981-1994. doi:<http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.04.007>
- Owens, D. W. y Lane, E. B.** (2003). The quest for the function of simple epithelial keratins. *Bioessays*, 25(8), 748-758. doi:<http://doi.org/10.1002/bies.10316>
- Paramio, J. M. y Jorcano, J. L.** (2002). Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling? *Bioessays*, 24(9), 836-844. doi:<http://doi.org/10.1002/bies.10140>
- Parent, D., Achten, G. y Stouffs-Vanhoof, F.** (1985). Ultrastructure of the normal human nail. *Am J Dermatopathol*, 7(6), 529-535. doi:<https://doi.org/10.1097/00000372-198512000-00004>
- Parry, D. A. y Steinert, P. M.** (1992). Intermediate filament structure. *Curr Opin Cell Biol*, 4(1), 94-98. doi:[http://doi.org/10.1016/0955-0674\(92\)90064-j](http://doi.org/10.1016/0955-0674(92)90064-j)
- Parry, D. A., Steven, A. C. y Steinert, P. M.** (1985). The coiled-coil molecules of intermediate filaments consist of two parallel chains in exact axial register. *Biochem Biophys Res Commun*, 127(3), 1012-1018. doi:[http://doi.org/10.1016/s0006-291x\(85\)80045-0](http://doi.org/10.1016/s0006-291x(85)80045-0)
- Pérez Pico, A. M., Mingorance Álvarez, E., Caballé Cervigón, N. y Mayordomo Acevedo, R.** (2019). Importance of Preexisting Physical Factors in the Development of Dermatological and Muscular Lesions During Hiking. *Int J Low Extrem Wounds*, 18(2), 161-170. doi:<https://doi.org/10.1177/1534734619845600>
- Pérez Pico, A. M., Verjano, E. y Mayordomo, R.** (2017). Relation between nail consistency and incidence of ingrown toenails in young male runners. *J Am Podiatr Med Assoc*, 107(2), 137-143. doi:<https://doi.org/10.7547/15-121>
- Perrin, C.** (2007). Expression of follicular sheath keratins in the normal nail with special reference to the morphological analysis of the distal nail unit. *Am J Dermatopathol*, 29(6), 543-550. doi:<http://doi.org/10.1097/DAD.0b013e318158d741>
- Perrin, C., Langbein, L. y Schweizer, J.** (2004). Expression of hair keratins in the adult nail unit: an immunohistochemical analysis of the onychogenesis in the proximal nail fold, matrix and nail bed. *Br J Dermatol*, 151(2), 362-371. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2004.06108.x>
- Pfister, R. y Heneka, J.** (1965). Wachstum und Gestaltung der Zehennägel bei Gesunden. *Archiv Ftir klinische u. experimentelle Dermatologie*(223), 263-274. doi:<http://doi.org/10.1007/BF00522468>
- Rainey, G.** (1849). On the Structure and Formation of the Nails of the Fingers and Toes. 2(1), 105-109. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1849.tb05112.x>

- Rice, R. H., Xia, Y., Alvarado, R. J. y Phinney, B. S. (2010). Proteomic analysis of human nail plate. *J Proteome Res*, 9(12), 6752-6758. doi:<https://doi.org/10.1021/pr1009349>
- Riddle, R. D., Ensini, M., Nelson, C., Tsuchida, T., Jessell, T. M. y Tabin, C. (1995). Induction of the LIM homeobox gene *Lmx1* by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell*, 83(4), 631-640. doi:[http://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90103-5](http://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90103-5)
- Robert, A., Hookway, C. y Gelfand, V. I. (2016). Intermediate filament dynamics: What we can see now and why it matters. *Bioessays*, 38(3), 232-243. doi:<http://doi.org/10.1002/bies.201500142>
- Rogers, M. A., Langbein, L., Praetzel-Wunder, S., Winter, H. y Schweizer, J. (2006). Human hair keratin-associated proteins (KAPs). *Int Rev Cytol*, 251, 209-263. doi:[https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(06\)51006-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)51006-X)
- Rohde, H., Wick, G. y Timpl, R. (1979). Immunochemical characterization of the basement membrane glycoprotein laminin. *Eur J Biochem*, 102(1), 195-201. doi:<http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1979.tb06280.x>
- Rouas-Freiss, N., Goncalves, R. M., Menier, C., Dausset, J. y Carosella, E. D. (1997). Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(21), 11520-11525. doi:<http://doi.org/10.1073/pnas.94.21.11520>
- Runne, U. y Orfanos, C. E. (1981). The human nail. Structure, growth and pathological changes. *Curr. Probl. Derm.*, 9, 102-149. doi:<https://doi.org/10.1159/000403346>
- Saito, M., Tucker, D. K., Kohlhorst, D., Niessen, C. M. y Kowalczyk, A. P. (2012). Classical and desmosomal cadherins at a glance. *J Cell Sci*, 125(11), 2547-2552. doi:<http://doi.org/10.1242/jcs.066654>
- Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A. D. y McLean, W. H. (2009). Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci*, 122(Pt 9), 1285-1294. doi:<http://doi.org/10.1242/jcs.033969>
- Sanghvi-Shah, R. y Weber, G. F. (2017). Intermediate Filaments at the Junction of Mechanotransduction, Migration, and Development. *Front Cell Dev Biol*, 5, 81. doi:<http://doi.org/10.3389/fcell.2017.00081>
- Sargon, M. F., Celik, H. H., Denk, C. C., Dagdeviren, A. y Leblebicioglu, G. (2003). Light and electron microscopic examination of human subungual tissue. Glomus and lamellated bodies. *Saudi Med J*, 24(10), 1126-1129.
- Schweizer, J., Bowden, P. E., Coulombe, P. A., Langbein, L., Lane, E. B., Magin, T. M., Maltais, L., Omary, M. B., Parry, D. A. D., Rogers, M. A. y Wright, M. W. (2006). New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol*, 174(2), 169-174. doi:<https://doi.org/10.1083/jcb.200603161>
- Serres, M. P., Samwer, M., Truong Quang, B. A., Lavoie, G., Perera, U., Gorlich, D., Charras, G., Petronczki, M., Roux, P. P. y Paluch, E. K. (2020). F-Actin Interactome Reveals Vimentin as a Key Regulator of Actin Organization and Cell Mechanics in Mitosis. *Dev Cell*, 52(2), 210-222 e217. doi:<http://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.12.011>
- Shemer, A. y Daniel, C. R., 3rd. (2013). Common nail disorders. *Clin Dermatol*, 31(5), 578-586. doi:<http://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.06.015>
- Smith, F. (2003). The molecular genetics of keratin disorders. *Am J Clin Dermatol*, 4(5), 347-364. doi:<http://doi.org/10.2165/00128071-200304050-00005>
- Snider, N. T., Leonard, J. M., Kwan, R., Griggs, N. W., Rui, L. y Omary, M. B. (2013). Glucose and SIRT2 reciprocally mediate the regulation of keratin 8 by lysine acetylation. *J Cell Biol*, 200(3), 241-247. doi:<http://doi.org/10.1083/jcb.201209028>
- Snider, N. T. y Omary, M. B. (2014). Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(3), 163-177. doi:<http://doi.org/10.1038/nrm3753>

- Snider, N. T., Weerasinghe, S. V., Iniguez-Lluhi, J. A., Herrmann, H. y Omary, M. B.** (2011). Keratin hypersumoylation alters filament dynamics and is a marker for human liver disease and keratin mutation. *J Biol Chem*, 286(3), 2273-2284. doi:<http://doi.org/10.1074/jbc.M110.171314>
- Stegink Jansen, C. W., Patterson, R. y Viegas, S. F.** (2000). Effects of fingernail length on finger and hand performance. *J Hand Ther*, 13(3), 211-217. doi:[http://doi.org/10.1016/s0894-1130\(00\)80004-6](http://doi.org/10.1016/s0894-1130(00)80004-6)
- Steinert, P. M.** (1991). Organization of coiled-coil molecules in native mouse keratin 1/keratin 10 intermediate filaments: evidence for alternating rows of antiparallel in-register and antiparallel staggered molecules. *J Struct Biol*, 107(2), 157-174. doi:[http://doi.org/10.1016/1047-8477\(91\)90019-s](http://doi.org/10.1016/1047-8477(91)90019-s)
- Steinert, P. M., Idler, W. W., Cabral, F., Gottesman, M. M. y Goldman, R. D.** (1981). In vitro assembly of homopolymer and copolymer filaments from intermediate filament subunits of muscle and fibroblastic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78(6), 3692-3696. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.78.6.3692>
- Steinert, P. M., Idler, W. W. y Zimmerman, S. B.** (1976). Self-assembly of bovine epidermal keratin filaments in vitro. *J Mol Biol*, 108(3), 547-567. doi:[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(76\)80136-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(76)80136-2)
- Steinert, P. M., Jones, J. C. y Goldman, R. D.** (1984). Intermediate filaments. *J Cell Biol*, 99(1 Pt 2), 22s-27s. doi:<http://doi.org/10.1083/jcb.99.1.22s>
- Steinert, P. M. y Marekov, L. N.** (1995). The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem*, 270(30), 17702-17711. doi:<http://doi.org/10.1074/jbc.270.30.17702>
- Steinert, P. M., Parry, D. A., Idler, W. W., Johnson, L. D., Steven, A. C. y Roop, D. R.** (1985). Amino acid sequences of mouse and human epidermal type II keratins of Mr 67,000 provide a systematic basis for the structural and functional diversity of the end domains of keratin intermediate filament subunits. *J Biol Chem*, 260(11), 7142-7149. doi:[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)88900-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)88900-1)
- Steinert, P. M., Parry, D. A., Racoosin, E. L., Idler, W. W., Steven, A. C., Trus, B. L. y Roop, D. R.** (1984). The complete cDNA and deduced amino acid sequence of a type II mouse epidermal keratin of 60,000 Da: analysis of sequence differences between type I and type II keratins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(18), 5709-5713. doi:<http://doi.org/10.1073/pnas.81.18.5709>
- Steinert, P. M., Steven, A. C. y Roop, D. R.** (1985). The molecular biology of intermediate filaments. *Cell*, 42(2), 411-420. doi:[http://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90098-4](http://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90098-4)
- Steinmetz, M. O., Stock, A., Schulthess, T., Landwehr, R., Lustig, A., Faix, J., Gerisch, G., Aebi, U. y Kammerer, R. A.** (1998). A distinct 14 residue site triggers coiled-coil formation in cortexillin I. *EMBO J*, 17(7), 1883-1891. doi:<http://doi.org/10.1093/emboj/17.7.1883>
- Stoler, A., Kopan, R., Duvic, M. y Fuchs, E.** (1988). Use of monospecific antisera and cRNA probes to localize the major changes in keratin expression during normal and abnormal epidermal differentiation. *Journal of Cell Biology*, 107(2), 427-446. doi:<https://doi.org/10.1083/jcb.107.2.427>
- Streilein, J. W.** (1993). Immune privilege as the result of local tissue barriers and immunosuppressive microenvironments. *Curr Opin Immunol*, 5(3), 428-432. doi:[http://doi.org/10.1016/0952-7915\(93\)90064-y](http://doi.org/10.1016/0952-7915(93)90064-y)
- Strnad, P., Windoffer, R. y Leube, R. E.** (2002). Induction of rapid and reversible cytokeratin filament network remodeling by inhibition of tyrosine phosphatases. *J Cell Sci*, 115(Pt 21), 4133-4148. doi:<http://doi.org/10.1242/jcs.00096>
- Suchard, R.** (1882). Des modifications des cellules de la matrice et du lit de l'ongle dans quelques cas pathologiques. *Arch Physiol*, 2, 445.

- Szeverenyi, I., Cassidy, A. J., Chung, C. W., Lee, B. T., Common, J. E., Ogg, S. C., Chen, H., Sim, S. Y., Goh, W. L., Ng, K. W., Simpson, J. A., Chee, L. L., Eng, G. H., Li, B., Lunny, D. P., Chuon, D., Venkatesh, A., Khoo, K. H., McLean, W. H., Lim, Y. P. y Lane, E. B. (2008). The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. *Hum Mutat*, 29(3), 351-360. doi:<http://doi.org/10.1002/humu.20652>
- Tabassum, H., Adil, M., Amin, S. S., Mohtashim, M., Bansal, R. y Agrawal, D. (2020). The Impact of Onychopathies on Quality of Life: A Hospital-based, Cross-sectional Study. *Indian Dermatol Online J*, 11(2), 187-194. doi:http://doi.org/10.4103/idoj.IDOJ_272_19
- Takeo, M., Chou, W. C., Sun, Q., Lee, W., Rabbani, P., Loomis, C., Taketo, M. M. y Ito, M. (2013). Wnt activation in nail epithelium couples nail growth to digit regeneration. *Nature*, 499(7457), 228-232. doi:<http://doi.org/10.1038/nature12214>
- Tao, G. Z., Looi, K. S., Toivola, D. M., Strnad, P., Zhou, Q., Liao, J., Wei, Y., Habtezion, A. y Omary, M. B. (2009). Keratins modulate the shape and function of hepatocyte mitochondria: a mechanism for protection from apoptosis. *J Cell Sci*, 122(Pt 21), 3851-3855. doi:<http://doi.org/10.1242/jcs.051862>
- Timpl, R., Rohde, H., Robey, P. G., Rennard, S. I., Foidart, J. M. y Martin, G. R. (1979). Laminin a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem*, 254(19), 9933-9937. doi:[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)83607-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)83607-4)
- Toivola, D. M., Krishnan, S., Binder, H. J., Singh, S. K. y Omary, M. B. (2004). Keratins modulate colonocyte electrolyte transport via protein mistargeting. *J Cell Biol*, 164(6), 911-921. doi:<http://doi.org/10.1083/jcb.200308103>
- Tosti, A., Cameli, N., Piraccini, B. M., Fanti, P. A. y Ortonne, J. P. (1994). Characterization of nail matrix melanocytes with anti-PEP1, anti-PEP8, TMH-1, and HMB-45 antibodies. *J Am Acad Dermatol*, 31(2 Pt 1), 193-196. doi:[http://doi.org/10.1016/s0190-9622\(94\)70144-x](http://doi.org/10.1016/s0190-9622(94)70144-x)
- Vaidya, M. M. y Kanojia, D. (2007). Keratins: markers of cell differentiation or regulators of cell differentiation? *J Biosci*, 32(4), 629-634. doi:<http://doi.org/10.1007/s12038-007-0062-8>
- van de Kerkhof, P. C., Pasch, M. C., Scher, R. K., Kersch, M., Gieler, U., Haneke, E. y Fleckman, P. (2005). Brittle nail syndrome: a pathogenesis-based approach with a proposed grading system. *J Am Acad Dermatol*, 53(4), 644-651. doi:<http://doi.org/10.1016/j.jaad.2004.09.002>
- Weston, G. y Payette, M. (2015). Update on lichen planus and its clinical variants. *Int J Womens Dermatol*, 1(3), 140-149. doi:<http://doi.org/10.1016/j.ijwd.2015.04.001>
- Wilson, N. J., Hansen, C. D., Azkur, D., Kocabas, C. N., Metin, A., Coskun, Z., Schwartz, M. E., Hull, P. R., McLean, W. H. y Smith, F. J. (2013). Recessive mutations in the gene encoding frizzled 6 cause twenty nail dystrophy--expanding the differential diagnosis for pachyonychia congenita. *J Dermatol Sci*, 70(1), 58-60. doi:<http://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.12.005>
- Windoffer, R., Beil, M., Magin, T. M. y Leube, R. E. (2011). Cytoskeleton in motion: the dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia. *J Cell Biol*, 194(5), 669-678. doi:<http://doi.org/10.1083/jcb.201008095>
- Zaiac, M. N. y Walker, A. (2013). Nail abnormalities associated with systemic pathologies. *Clin Dermatol*, 31(5), 627-649. doi:<http://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.06.018>
- Zaias, N. (1963). Embryology of the human nail. *Arch Dermatol*, 87, 37-53. doi:<http://doi.org/10.1001/archderm.1963.01590130043010>
- Zaias, N. y Alvarez, J. (1968). The formation of the primate nail plate. An autoradiographic study in squirrel monkey. *J Invest Dermatol*, 51(2), 120-136. doi:<http://doi.org/10.1038/jid.1968.103>
- Zander, R. (1886). Untersuchungen über den verhornungsprogress: die histogenese des nagels beim menschlichen fetus. *Arch Anat Entwicklungsmech*, 273.

Zook, E. G. (2002). Anatomy and physiology of the perionychium. *Hand Clin*, 18(4), 553-559, v.
doi:[http://doi.org/10.1016/s0749-0712\(02\)00026-4](http://doi.org/10.1016/s0749-0712(02)00026-4)

A scanning electron microscope (SEM) image showing a cross-section of a layered material. The top part of the image shows a relatively flat, layered surface with some small cracks and irregularities. Below this, the material becomes increasingly textured and porous, with many small, interconnected layers and voids, suggesting a complex, multi-layered structure. The overall appearance is that of a highly textured, layered material, possibly a biological or synthetic material.

Capítulo I

Desarrollo de un modelo predictivo de la consistencia ungueal basado en el análisis de la composición elemental de la lámina ungueal mediante la técnica SEM-EDS

INTRODUCCIÓN

Microscopio electrónico

Básicamente, los microscopios electrónicos se diferencian de los microscopios ópticos en que los primeros emiten un haz de electrones de alta energía en lugar de un haz de fotones para incidir en la muestra (Mingyou *et al.*, 2020), lo que incrementa notablemente su poder de resolución (Harris, 2015).

Microscopio electrónico de barrido (SEM)

El SEM es un tipo de microscopio electrónico muy versátil que permite obtener imágenes tridimensionales de las superficies analizadas, actuando de forma análoga a la lupa, pero con una capacidad de aumento superior (Caldas *et al.*, 2020). A grandes rasgos, este microscopio consta de una columna en la que se localizan: la fuente de electrones (filamento), el cañón de electrones, las lentes y los detectores, y un ordenador que contiene el sistema informático a través de la cual se controla el microscopio con una pantalla para la visualización de las imágenes obtenidas (Figura 8).



Figura 8. Fotografía del SEM perteneciente al servicio de análisis y caracterización de sólidos y superficies. Servicios de apoyo a la investigación de la Universidad de Extremadura.

Cuando los electrones del haz inciden sobre la muestra se liberan distintos tipos de señales con diferentes niveles de energía, entre las que se encuentran: electrones secundarios, electrones retrodispersados y rayos X característicos (Luklanoff, 1987). Estas señales se pueden captar mediante distintos detectores específicos para cada una de ellas, amplificarlas y convertirlas en imágenes que ofrecen distintos tipos de información, desde la topográfica hasta la composicional, pasando por la cristalográfica (Goldstein *et al.*, 2003).

SEM con espectroscopia de dispersión de energía de rayos X (EDS)

Esta técnica se basa en la detección de los rayos X característicos procedentes de la interacción de la muestra con los electrones del haz incidente y se puede implementar tanto en microscopios electrónicos de barrido como de transmisión (Samuleson, 1998). Esta denominación de rayos X característicos obedece a que el nivel de energía de los rayos X generados en la interacción es característica de cada uno de los elementos químicos presentes en la muestra (Fernandez-Segura y Warley, 2008) y depende también, de la cantidad relativa en la que se encuentran los elementos (Goldstein *et al.*, 2003). Se trata, por tanto, de una técnica muy versátil y ampliamente empleada en el desarrollo de análisis cualitativos y semicuantitativos de una gran diversidad de disciplinas, aumentando su exactitud y precisión al ritmo al que se producen los avances tecnológicos (Newbury y Ritchie, 2015). Es por eso por lo que esta técnica tan versátil se ha elegido para analizar la composición elemental de las láminas ungueales, pues su uso está ampliamente extendido en los análisis cualitativos y semicuantitativos, aumentando su exactitud y precisión al ritmo al que se producen los avances tecnológicos (Newbury y Ritchie, 2015). Sin embargo, y a pesar su enorme aplicabilidad, solo existe evidencia científica de un trabajo previo en el que se empleó esta técnica para el estudio de la oncodistrofia severa producida por el uso de pegamento de cianocrilato (Pinteala *et al.*, 2016).

Los detectores EDS empleados captan las diferentes longitudes de onda de los rayos X característicos emitidos (Scimeca *et al.*, 2018) de cada uno de los elementos presentes en la muestra cuyo número atómico sea >5 . Por lo que, los únicos elementos que no se pueden detectar son: hidrógeno, helio, litio y berilio (Pinteala *et al.*, 2016).

La señal captada por el detector EDS se representa en un espectro de rayos X, en el que el eje x contiene la energía de los rayos X (keV) y el eje y contiene el número de cuentas (k). La posición de cada pico identifica al elemento químico y el área bajo el mismo es proporcional al número de átomos del elemento en el área irradiada (Fernandez-Segura y Warley, 2008). La cuantificación del espectro EDS se obtiene en porcentaje de peso (WT%) y porcentaje atómico (AT%). El WT% se define como porcentaje del peso del elemento medido en la muestra dividido entre el peso de todos los elementos de la muestra, mientras que el AT%, es el porcentaje del número de átomos del elemento, dividido por el número de átomos total en la muestra.

Contenido aminoacídico y elemental de las queratinas

Las láminas ungueales contienen una gran variedad de proteínas, describiéndose hasta 144 tipos diferentes entre: proteínas citoplasmáticas, de membrana, de unión e incluso histonas (Rice *et al.*, 2010), pero destaca sobre el resto la cantidad de queratinas que contienen (Wang *et al.*, 2016). Los aminoácidos que componen las queratinas presentes en las láminas ungueales varían en función de si se localizan en el dominio de cabeza, el dominio central o dominio de cola (Rice *et al.*, 2010). Aunque los aminoácidos cisteína y ácido glutámico representan un elevado porcentaje del total de la secuencia aminoacídica, los aminoácidos glutamato, leucina, alanina y glutamina son mucho más abundantes en el dominio central, y residuos de serina y glicina se encuentran más frecuentemente en los dominios de cabeza y cola (Strnad, Pavel *et al.*, 2011). De hecho, este elevado contenido en aminoácidos azufrados en los dominios de cabeza y cola diferencia a las queratinas de pelo propias de tejidos altamente queratinizados como las láminas ungueales de las queratinas epiteliales (Rogers *et al.*, 2006).

En consonancia con este contenido aminoacídico de las queratinas se han determinado las concentraciones de los elementos químicos presentes en mayor proporción (carbono, oxígeno, nitrógeno y azufre) y aquellos minoritarios (calcio, magnesio, aluminio, silicio y sodio) en láminas ungueales mediante SEM-EDS (Pinteala *et al.*, 2016; Laubé *et al.*, 2019). En este sentido, la elevada presencia de aminoácidos azufrados, especialmente de cisteínas, permite el establecimiento de puentes disulfuro que garanticen la estabilidad estructural de estas proteínas, así como de la lámina ungueal (Baraldi *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016).

OBJETIVOS

1. Determinar la composición elemental en las tres capas que conforman las láminas ungueales mediante SEM-EDS.
2. Analizar si existen diferencias a nivel de composición elemental entre las capas de la lámina ungueal.
3. Analizar si la composición elemental de las láminas ungueales está relacionada con la edad, el sexo, el índice de masa corporal, el grosor de las láminas ungueales, el hábito tabáquico o la consistencia ungueal.
4. Diseñar un modelo matemático que permita predecir la consistencia ungueal a partir de los datos de composición elemental de las láminas ungueales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Permisos, descripción de la muestra y criterios de inclusión

El presente trabajo cuenta con la autorización del Comité de Bioética de la Universidad de Extremadura (Nº Registro: 116/2016, Anexo I) y se ha desarrollado de acuerdo con los principios éticos establecidos en la Declaración de 1975 de Helsinki y sus revisiones posteriores. Todos los participantes firmaron un consentimiento previo a su participación.

La muestra se compuso de 57 individuos (29 mujeres y 28 hombres) divididos en dos franjas de edad: jóvenes (21.50 ± 2.87 años) y adultos (50.11 ± 3.43 años) (Tabla 2). Además, se seleccionaron 2 individuos más para probar el modelo una vez desarrollado: una mujer adulta y fumadora con uñas de consistencia dura y un hombre adulto y no fumador con uñas de consistencia blanda.

La obtención de la información sanitaria necesaria se realizó mediante una exploración física de los pies y la cumplimentación de un cuestionario de salud (Anexo I). Los criterios de inclusión fueron: ser mayor de edad, no tener enfermedades diagnosticadas que puedan alterar la estructura y/o composición de la uña, no tomar medicación que esté descrito que altere la estructura y/o composición de la uña, seguir la dieta mediterránea y no haber empleado esmaltes, lacas o cualquier otra sustancia sobre las láminas ungueales del primer dedo de los pies.

Tabla 2. Descripción de la muestra seleccionada para la elaboración del modelo predictivo de la consistencia ungueal.

VARIABLE	TOTAL n=57		HOMBRE JOVEN (DT) n=15		HOMBRE ADULTO (DT) n=13		MUJER JOVEN (DT) n=15		MUJER ADULTA (DT) n=14	
	Edad (años)	35.05 ($\pm 14,75$)		22.40 ($\pm 3,54$)		51.08 ($\pm 3,50$)		20.60 ($\pm 1,68$)		49.21 ($\pm 3,24$)
IMC (kg/m ²)	25.37 ($\pm 4,18$)		25.30 ($\pm 4,16$)		26.53 ($\pm 3,90$)		23.95 ($\pm 2,84$)		25.91 ($\pm 5,48$)	
Grosor (μm)	558.19 ($\pm 165,40$)		647.52 ($\pm 131,77$)		542.33 ($\pm 128,43$)		451.87 ($\pm 151,66$)		591.12 ($\pm 188,37$)	
Fumador	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N
	n=20 (35.09%)	n=37 (64,91)	n=8 (53.33)	n=7 (46.67)	n=5 (38.46)	n=8 (61.54)	n=3 (20.00)	n=12 (80.00)	n=4 (28.57)	n= 10 (71.43)
Consistencia	D	B	D	B	D	B	D	B	D	B
	n=33 (57.90%)	n=24 (42.10%)	n=8 (53.33%)	n=7 (46.67%)	n= 8 (61.54%)	n=5 (38.46%)	n=8 (53.33%)	n=7 (46.67%)	n=9 (64.29%)	n=5 (35.71%)

n: tamaño muestral, DT: desviación típica, IMC: índice de masa corporal, kg: kilogramo, m²: metro cuadrado, μm : micrómetro, S: sí, N: no, D: dura, B: blanda.

Determinación de la consistencia ungueal y obtención de muestras

La determinación de la consistencia ungueal se realizó *in vivo* tras atemperar el pie ejerciendo presión manualmente sobre los bordes en el eje latero-medial y dorso-ventral del aparato ungueal, siguiendo la metodología descrita previamente en (Pérez Pico *et al.*, 2017).

Las muestras se obtuvieron del borde libre del primer dedo del pie, con el mismo cortaúñas y sin comprometer la integridad de la banda onicodérmica. Para eliminar las células muertas, fibras y otros posibles residuos acumulados bajo las láminas ungueales, se procedió a su tratamiento por inmersión en baño de ultrasonidos (Ultrasonic LC60H, Elma, Alemania). Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis.

Técnica de microscopía electrónica de barrido y determinación del grosor

El análisis elemental se llevó a cabo mediante la técnica SEM-EDS. El microscopio utilizado (Quanta 3D FEG, FEI, Eindhoven, Países Bajos) se equipó con el detector (BSED, FEI, Eindhoven, Países Bajos) para la obtención de imágenes y con el detector (Octane Elect Plus, AMETEK, Mahwah, NJ, Estados Unidos) para realizar el análisis elemental.

Debido al bajo contenido en agua de las muestras y al equipo utilizado, el análisis se realizó sin necesidad de realizar ningún pretratamiento que pudiera modificar el resultados del análisis elemental o producir artefactos (Takaku *et al.*, 2020). El análisis elemental se realizó en condiciones de bajo vacío (100-120 Pa) y en atmósfera de vapor de agua (voltaje de aceleración: 20kV, inclinación: 0, take-off ángulo: 33.80–36.40, detector: octane elect plus, resolución: 125eV, tiempo de amplificación: 3.84µs, FS: 2351-65222fs, Lsec: 26-185s, tiempo dwell: 500ns). Se aplicó el método de corrección estandarizado ZAF (Z: número atómico, A: absorción, F: fluorescencia).

Las mediciones se realizaron sobre la superficie opuesta al borde libre de cada muestra, es decir sobre la superficie obtenida con la herramienta de corte y se realizó un triple análisis: en la capa dorsal, intermedia y ventral (Figura 9). Para determinar las áreas de medida, se consideraron tanto los límites visuales discernibles en la micrografía como los grosores relativos de cada capa descritos en la bibliografía (3:5:2) (Kobayachi *et al.*, 1999). Fueron necesarios los dos criterios porque en algunos casos los límites se

podrían apreciar visualmente con facilidad, (límite de la capa dorsal de la Figura 9) pero en otros, era necesario tener en consideración los grosores relativos de cada capa pues el establecimiento del límite visualmente no era evidente (límite de la capa ventral Figura 9).

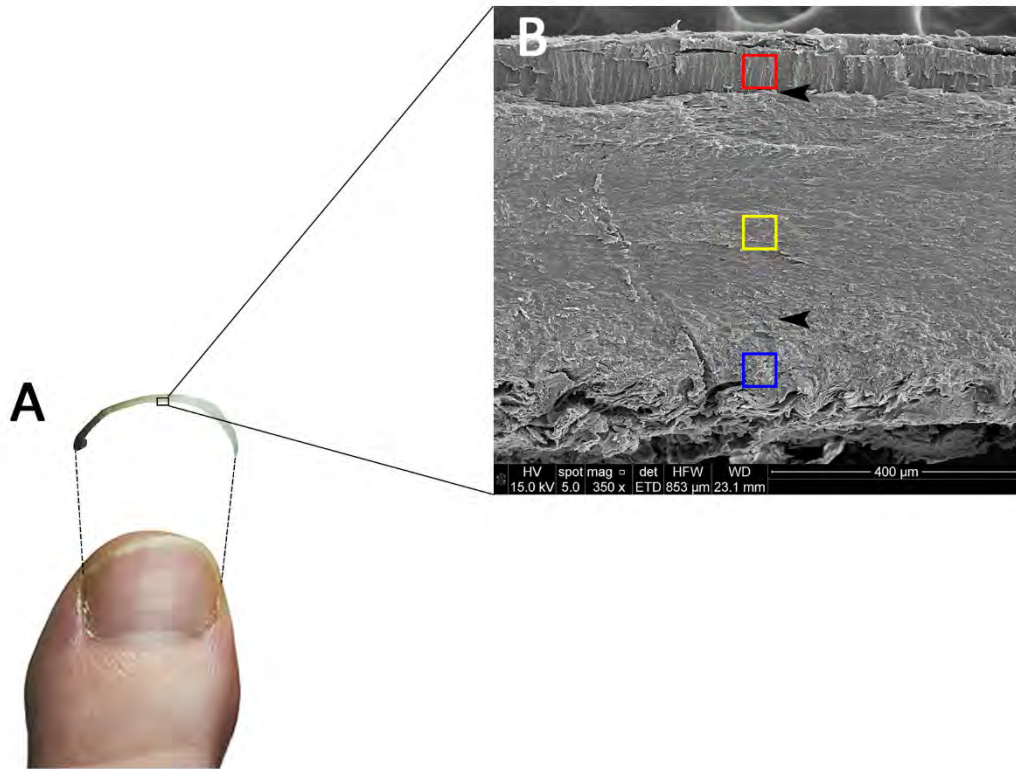


Figura 9. Obtención de la muestra y áreas de medida de la composición elemental. A: aparato ungual del primer dedo del pie izquierdo y ejemplo de muestra obtenida del borde libre. B: micrografía electrónica de barrido ilustrando las áreas de medida seleccionadas. Área dorsal (cuadro rojo), área intermedia (cuadro amarillo) y área ventral (cuadro azul). Las cabezas de flecha indican los límites entre las capas.

La medida del grosor de las láminas ungueales se realizó sobre las imágenes obtenidas con SEM mediante el software libre de procesamiento de imagen ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). En total se tomaron 10 medidas al azar sobre cada una de las muestras y se calculó la media y la desviación típica.

Tratamiento estadístico

El tratamiento estadístico se realizó con el software estadístico SPSS para Windows, versión 22.0 (IBM, Armonk, NY, Estados Unidos). Los análisis de correlación

entre las variables WT% y AT% se evaluaron mediante los coeficientes de correlación muestral de Pearson y Spearman. El análisis de la normalidad se realizó mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. La prueba de Friedman para muestras relacionadas junto con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey permitió detectar las diferencias entre capas para cada elemento. Para comparar el comportamiento de las variables cuantitativas consideradas con respecto a la consistencia se utilizó la prueba de Wilcoxon de suma de rangos para dos muestras independientes. Asimismo, se utilizó la prueba Chi-cuadrado para contrastar la independencia de las variables sexo y fumador con respecto a la consistencia. Finalmente, para estudiar la consistencia como variable cualitativa dicotómica dependiente se utilizó una técnica multivariante predictiva de regresión, la Regresión Logística Binaria, con el método hacia adelante condicional. En todos los análisis realizados el nivel de significación fue de 0.05.

RESULTADOS

Los resultados de la composición elemental obtenidos de la técnica SEM-EDS incluyen un espectro de rayos X y una tabla con la cuantificación de cada elemento y capa (Figura 10).

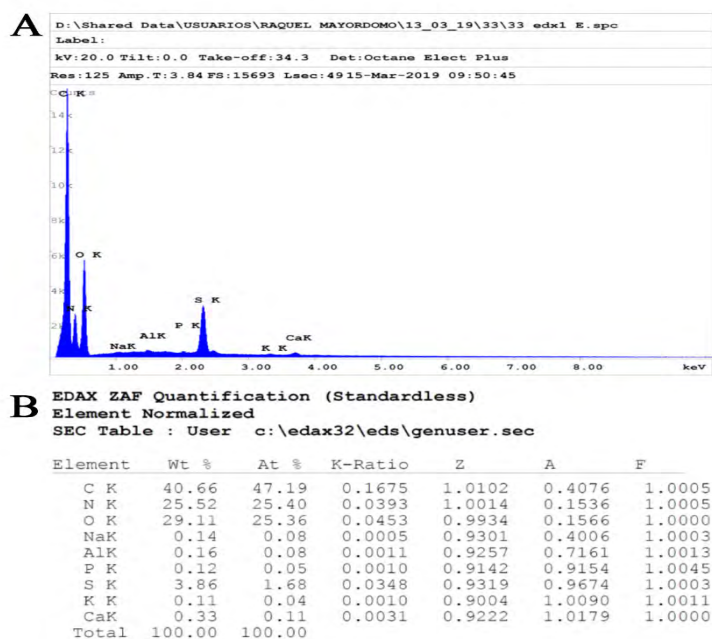


Figura 10. Resultados obtenidos mediante SEM-EDS. A: espectro de rayos X de la cuantificación. B: tabla de la cuantificación elemental de la capa dorsal de la muestra 33.

Las pruebas de correlación realizadas demostraron que ambas variables WT% y AT% correlacionan fuertemente de forma directa para cada elemento y capa, con coeficientes muy próximos a 1. El menor valor de correlación se obtuvo para el elemento silicio de la capa dorsal: Pearson=0.97 y Spearman=0.97 (p-valores<1/1000). Por tanto, el resto de los análisis estadísticos se realizó empleando únicamente la variable WT%, puesto que AT% no aportaba más información que la proporcionada por WT%.

Se realizaron un total de 72 pruebas para analizar la normalidad de cada elemento en cada una de las capas en función de la consistencia. Las variables no siguieron la distribución normal en el 72.22% de las pruebas realizadas (n=52) para la prueba de Kolmogórov-Smirnov y en el 80.56% (n=58) para la prueba de Shapiro-Wilk (p-valores<0.043).

La técnica SEM-EDS permitió identificar un total de 12 elementos: carbono, nitrógeno, oxígeno, sodio, magnesio, aluminio, silicio, fósforo, azufre, cloro, potasio y calcio en las muestras analizadas. Se detectaron en las capas dorsal (Tabla 3), intermedia (Tabla 4) y ventral (Tabla 5) aunque no todos los elementos fueron detectados en todas las capas analizadas. Los elementos carbono, oxígeno y nitrógeno mostraron mayores valores medios de WT% en las láminas analizadas $39.58\pm 1.24\%$, $30.41\pm 0.41\%$ y $25.49\pm 0.86\%$, respectivamente. El resto de los elementos, mostraron valores muy inferiores, por debajo del 0.50% de media, excepto el azufre $3.63\pm 0.55\%$ (Tabla 3, Tabla 4 y Tabla 5).

Tabla 3. Valores WT% de los elementos en la capa dorsal.

MUESTRA	Con.	WT% CAPA DORSAL											
		C	N	O	Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	K	Ca
33	D	40.66	25.52	29.11	0.14	0.00	0.16	0.00	0.12	3.86	0.00	0.11	0.33
44	D	41.96	25.12	27.88	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.59	0.00	0.21	0.25
45	B	41.67	24.72	28.51	0.31	0.07	0.13	0.14	0.08	3.58	0.18	0.20	0.40
52	B	39.52	24.26	30.23	0.00	0.00	1.01	0.12	0.00	4.02	0.00	0.26	0.56
61	B	42.10	25.90	26.64	0.00	0.00	0.14	0.00	0.00	4.92	0.00	0.00	0.29
62	B	39.82	27.04	29.61	0.00	0.00	0.17	0.00	0.00	3.35	0.00	0.00	0.00
63	D	42.32	22.52	24.95	0.00	0.00	0.49	0.15	0.25	7.47	0.33	0.34	1.19
90	D	39.10	27.66	30.67	0.00	0.00	0.17	0.00	0.00	2.24	0.04	0.00	0.12
98	B	39.76	27.60	29.32	0.00	0.00	0.14	0.00	0.00	3.01	0.06	0.00	0.11
103	D	39.38	28.17	29.51	0.00	0.00	0.25	0.00	0.00	2.39	0.00	0.00	0.30
106	B	38.81	27.95	30.07	0.00	0.00	0.24	0.00	0.00	2.93	0.00	0.00	0.00
122	D	38.73	26.64	30.29	0.12	0.03	0.14	0.00	0.20	3.43	0.00	0.00	0.42
124	D	40.17	26.29	30.10	0.18	0.00	0.35	0.00	0.00	2.58	0.00	0.13	0.21
135	B	38.65	26.90	32.19	0.00	0.00	0.20	0.00	0.00	2.06	0.00	0.00	0.00
139	D	40.27	25.73	27.80	0.08	0.06	0.16	0.08	0.00	5.71	0.00	0.11	0.00
158	B	36.33	28.14	32.68	0.00	0.08	0.81	0.00	0.04	1.81	0.00	0.00	0.10
192	B	38.24	27.40	31.74	0.00	0.00	0.43	0.00	0.00	2.09	0.00	0.00	0.10
196	D	41.15	27.45	27.89	0.13	0.00	0.19	0.06	0.00	2.78	0.16	0.11	0.08

210	D	38.24	27.76	31.41	0.00	0.00	0.45	0.00	0.00	2.09	0.00	0.05	0.00
282	D	45.53	22.93	27.05	0.00	0.00	0.40	0.00	0.00	3.76	0.00	0.00	0.32
351	D	40.03	26.23	29.46	0.00	0.00	0.40	0.00	0.10	3.50	0.05	0.00	0.22
368	D	40.96	25.33	29.09	0.00	0.00	0.15	0.08	0.17	3.69	0.00	0.00	0.52
413	D	36.77	21.20	37.67	1.87	0.16	0.23	0.00	0.00	1.44	0.00	0.00	0.67
501	D	39.91	26.03	30.40	0.00	0.00	0.22	0.00	0.00	3.31	0.00	0.00	0.13
576	D	39.08	26.07	31.49	0.10	0.00	0.26	0.13	0.00	2.66	0.00	0.00	0.22
577	D	41.14	17.12	28.76	0.00	0.40	5.39	0.17	0.60	4.38	0.00	1.26	0.78
586	B	41.93	24.74	26.08	0.17	0.07	0.14	0.11	0.10	6.00	0.18	0.19	0.28
77	B	40.74	25.50	30.27	0.16	0.00	0.13	0.05	0.00	2.98	0.00	0.00	0.17
78	B	33.88	30.47	33.93	0.00	0.00	0.59	0.00	0.00	1.13	0.00	0.00	0.00
86	B	45.03	23.35	24.24	0.00	0.00	0.93	0.11	0.00	6.35	0.00	0.00	0.00
87	D	37.48	29.92	29.81	0.00	0.00	0.37	0.00	0.00	2.42	0.00	0.00	0.00
95	D	41.65	24.11	27.00	0.00	0.00	0.65	0.10	0.16	5.69	0.00	0.00	0.63
100	D	42.16	24.54	28.19	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	4.83	0.00	0.00	0.21
102	D	35.74	30.5	31.96	0.00	0.00	0.57	0.00	0.00	1.24	0.00	0.00	0.00
112	B	39.68	24.12	33.22	0.00	0.11	1.82	0.06	0.00	0.99	0.00	0.00	0.00
114	D	37.98	27.05	32.53	0.00	0.00	0.12	0.00	0.00	2.19	0.00	0.00	0.13
156	B	42.08	23.02	30.56	0.00	0.09	0.15	0.00	0.00	3.96	0.00	0.00	0.12
170	D	42.48	22.30	29.86	0.22	0.09	0.34	0.12	0.00	4.26	0.00	0.00	0.32
184	D	45.67	20.66	28.33	0.00	0.00	0.25	0.07	0.00	4.57	0.00	0.11	0.34
280	B	38.54	25.74	33.89	0.00	0.00	0.23	0.00	0.00	1.59	0.00	0.00	0.00
363	B	41.74	24.38	30.20	0.00	0.00	0.24	0.05	0.09	3.11	0.00	0.00	0.19
76	D	42.85	22.95	30.27	0.00	0.00	0.66	0.00	0.00	3.10	0.00	0.00	0.16
83	D	42.46	23.06	31.05	0.18	0.00	0.53	0.08	0.00	2.24	0.14	0.11	0.16
238	D	42.81	23.09	30.50	0.28	0.00	0.91	0.20	0.00	2.02	0.00	0.07	0.14
259	D	44.98	21.08	29.15	0.00	0.00	0.27	0.14	0.00	3.70	0.20	0.00	0.48
266	B	41.64	23.24	30.58	0.22	0.00	0.24	0.07	0.00	3.42	0.15	0.22	0.22
278	D	46.46	18.98	30.40	0.30	0.07	0.34	0.16	0.00	2.39	0.14	0.16	0.60
297	D	41.92	22.99	30.87	0.00	0.00	0.17	0.00	0.14	3.45	0.00	0.00	0.46
326	D	42.02	23.02	30.61	0.00	0.00	0.43	0.11	0.00	3.56	0.00	0.00	0.25
340	B	43.82	22.33	30.26	0.26	0.00	0.20	0.00	0.00	2.50	0.24	0.18	0.21
342	D	42.25	23.09	30.08	0.00	0.00	0.22	0.00	0.18	3.66	0.00	0.00	0.52
441	B	43.12	22.90	29.09	0.00	0.00	0.27	0.07	0.00	4.08	0.13	0.15	0.20
458	D	42.42	23.47	28.97	0.28	0.00	0.37	0.00	0.13	3.85	0.21	0.00	0.30
599	B	38.45	23.58	32.82	0.76	0.20	1.57	0.17	0.00	2.16	0.00	0.11	0.19
600	B	38.08	25.00	32.81	0.44	0.11	0.93	0.00	0.15	1.74	0.28	0.11	0.35
601	B	39.83	25.42	30.80	0.22	0.08	0.26	0.13	0.00	3.13	0.00	0.00	0.14
121	B	54.45	16.14	24.43	0.37	0.11	0.32	0.00	0.00	3.41	0.26	0.21	0.19
Total		40.96	24.71	29.95	0.12	0.03	0.47	0.05	0.04	3.29	0.05	0.08	0.25
media±DT		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		3.07	2.84	2.34	0.28	0.07	0.74	0.06	0.10	1.32	0.09	0.18	0.23

WT%: porcentaje peso, Con.: consistencia ungueal, C: carbono, N: nitrógeno, O: oxígeno, Na: sodio, Mg: magnesio, Al: aluminio, Si: silicio, P: fósforo, S: azufre, Cl: cloruro, K: potasio, Ca: calcio, D: dura, B: blanda, DT: desviación típica.

Tabla 4. Valores WT% de los elementos en la capa intermedia.

MUESTRA	Con.	WT% CAPA INTERMEDIA											
		C	N	O	Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	K	Ca
33		40.03	24.50	30.69	0.00	0.00	0.21	0.05	0.00	4.29	0.00	0.08	0.14
44	D	39.57	24.60	30.64	0.15	0.00	0.11	0.00	0.07	4.60	0.00	0.19	0.07
45	B	41.63	22.59	28.64	0.08	0.09	0.72	0.07	0.06	5.58	0.21	0.19	0.14
52	B	38.86	27.22	29.75	0.18	0.05	0.19	0.05	0.00	3.69	0.00	0.00	0.00
61	B	39.55	24.88	30.80	0.11	0.04	0.19	0.06	0.00	4.28	0.00	0.00	0.09
62	B	41.31	23.14	29.73	0.00	0.00	0.33	0.08	0.00	5.29	0.00	0.07	0.04
63	D	39.84	24.55	29.96	0.00	0.00	0.18	0.08	0.00	5.30	0.02	0.00	0.07
90	D	37.67	27.79	30.79	0.00	0.00	0.23	0.00	0.00	3.49	0.03	0.00	0.00
98	B	33.73	29.46	34.78	0.00	0.00	0.24	0.00	0.00	1.79	0.00	0.00	0.00
103	D	35.24	30.62	31.69	0.00	0.00	0.48	0.00	0.16	1.81	0.00	0.00	0.00
106	B	33.99	29.53	34.42	0.00	0.00	0.55	0.00	0.00	1.51	0.00	0.00	0.00
122	D	37.72	27.22	31.92	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	3.03	0.00	0.00	0.00
124	D	38.73	25.49	30.39	0.20	0.00	0.13	0.04	0.00	4.67	0.00	0.22	0.12
135	B	38.88	26.56	30.47	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	3.97	0.00	0.00	0.00

139	D	39.79	25.80	29.08	0.00	0.00	0.17	0.07	0.00	5.09	0.00	0.00	0.00
158	B	36.53	27.12	33.03	0.00	0.00	0.12	0.00	0.00	3.10	0.00	0.00	0.10
192	B	39.56	24.97	31.01	0.19	0.08	0.15	0.09	0.00	3.64	0.00	0.11	0.19
196	D	35.31	29.87	32.53	0.00	0.00	0.52	0.00	0.00	1.78	0.00	0.00	0.00
210	D	39.39	26.16	29.34	0.00	0.00	0.14	0.05	0.00	4.84	0.08	0.00	0.00
282	D	38.34	27.14	30.88	0.00	0.00	0.22	0.00	0.00	3.42	0.00	0.00	0.00
351	D	37.83	27.47	31.19	0.00	0.00	0.38	0.00	0.00	3.13	0.00	0.00	0.00
368	D	38.13	27.15	30.94	0.00	0.00	0.12	0.00	0.00	3.65	0.00	0.00	0.00
413	D	36.10	23.83	35.92	0.86	0.09	0.16	0.06	0.00	2.74	0.00	0.00	0.24
501	D	39.71	26.08	28.65	0.00	0.00	0.16	0.06	0.00	5.33	0.00	0.00	0.00
576	D	43.24	23.33	25.41	0.00	0.00	0.64	0.10	0.00	7.27	0.00	0.00	0.00
577	D	39.25	26.16	29.98	0.00	0.07	0.12	0.00	0.15	4.28	0.00	0.00	0.00
586	B	40.12	25.9	28.27	0.13	0.02	0.10	0.05	0.00	5.18	0.12	0.09	0.02
77	B	39.53	26.32	29.43	0.15	0.00	0.11	0.06	0.00	4.39	0.00	0.00	0.00
78	B	39.55	26.24	29.40	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00	4.50	0.00	0.00	0.11
86	B	35.11	28.61	33.77	0.00	0.00	0.80	0.03	0.00	1.69	0.00	0.00	0.00
87	D	34.08	29.45	34.62	0.00	0.00	0.44	0.00	0.00	1.41	0.00	0.00	0.00
95	D	36.95	27.01	32.87	0.00	0.00	0.68	0.00	0.00	2.48	0.00	0.00	0.00
100	D	41.00	24.79	26.38	0.00	0.00	0.50	0.09	0.00	6.72	0.00	0.23	0.30
102	D	37.68	26.39	32.37	0.00	0.00	0.37	0.00	0.00	3.18	0.00	0.00	0.00
112	B	41.13	22.58	32.93	0.00	0.17	1.70	0.10	0.00	1.40	0.00	0.00	0.00
114	D	36.19	27.86	33.32	0.00	0.00	0.16	0.00	0.00	2.46	0.00	0.00	0.00
156	B	41.8	23.41	28.98	0.00	0.09	0.21	0.00	0.00	5.35	0.00	0.00	0.15
170	D	38.79	25.22	30.84	0.00	0.00	0.19	0.06	0.00	4.76	0.00	0.00	0.15
184	D	43.15	21.51	27.96	0.00	0.00	0.29	0.06	0.10	6.47	0.00	0.14	0.32
280	B	39.31	25.09	31.10	0.00	0.00	0.24	0.00	0.00	4.16	0.00	0.00	0.09
363	B	39.98	23.39	30.96	0.12	0.00	0.24	0.08	0.00	4.94	0.00	0.12	0.17
76	D	41.81	22.34	28.76	0.00	0.00	0.3	0.00	0.00	6.79	0.00	0.00	0.00
83	D	40.19	23.85	29.62	0.21	0.00	0.18	0.03	0.00	5.39	0.26	0.20	0.08
238	D	41.63	23.63	28.71	0.00	0.00	0.33	0.09	0.00	5.43	0.00	0.00	0.18
259	D	40.06	24.22	30.13	0.00	0.00	0.22	0.07	0.00	5.13	0.00	0.00	0.16
266	B	38.90	24.53	31.41	0.17	0.00	0.17	0.00	0.00	4.34	0.00	0.25	0.24
278	D	41.03	22.95	29.27	0.17	0.00	0.33	0.07	0.00	6.10	0.00	0.00	0.08
297	D	38.83	24.43	32.18	0.18	0.00	0.19	0.00	0.00	4.19	0.00	0.00	0.00
326	D	39.36	24.57	30.54	0.13	0.03	0.22	0.05	0.00	5.07	0.00	0.00	0.03
340	B	40.53	23.42	29.21	0.18	0.00	0.28	0.06	0.11	5.70	0.00	0.20	0.31
342	D	38.49	25.25	31.39	0.00	0.00	0.22	0.07	0.00	4.46	0.00	0.00	0.13
441	B	38.68	25.17	31.12	0.00	0.00	0.20	0.00	0.00	4.62	0.00	0.00	0.21
458	D	40.81	23.43	28.87	0.25	0.00	0.56	0.00	0.00	5.92	0.15	0.00	0.00
599	B	42.02	23.51	27.24	0.10	0.00	0.35	0.09	0.05	6.17	0.12	0.11	0.25
600	B	36.71	25.83	32.16	0.42	0.00	0.65	0.00	0.00	3.54	0.43	0.13	0.13
601	B	38.37	25.48	30.84	0.17	0.00	0.24	0.10	0.00	4.50	0.17	0.12	0.00
121	B	54.24	15.82	23.15	0.38	0.06	0.22	0.11	0.00	5.41	0.31	0.22	0.09
Total		39.23	25.36	30.53	0.08	0.01	0.31	0.04	0.01	4.27	0.03	0.05	0.08
media±DT		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		2.98	2.43	2.26	0.15	0.03	0.26	0.04	0.04	1.46	0.09	0.08	0.09

WT%: porcentaje peso, Con.: consistencia ungueal, C: carbono, N: nitrógeno, O: oxígeno, Na: sodio, Mg: magnesio, Al: aluminio, Si: silicio, P: fósforo, S: azufre, Cl: cloruro, K: potasio, Ca: calcio, D: dura, B: blanda, DT: desviación típica.

Tabla 5. Valores WT% de los elementos en la capa intermedia.

MUESTRA	WT% CAPA VENTAL												
	Con.	C	N	O	Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	K	Ca
33	D	37.77	26.08	31.87	0.00	0.00	0.22	0.05	0.00	3.79	0.00	0.10	0.13
44	D	36.44	26.66	33.15	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	3.51	0.00	0.15	0.00
45	B	40.02	26.58	28.58	0.09	0.00	0.26	0.11	0.08	3.94	0.14	0.07	0.15
52	B	36.38	30.72	30.04	0.15	0.00	0.27	0.00	0.00	2.44	0.00	0.00	0.00
61	B	38.07	27.74	30.74	0.00	0.00	0.11	0.00	0.00	3.34	0.00	0.00	0.00
62	B	39.95	26.72	31.48	0.00	0.00	0.33	0.00	0.00	1.51	0.00	0.00	0.00
63	D	41.90	23.91	29.04	0.00	0.00	0.20	0.07	0.00	4.88	0.00	0.00	0.00
90	D	32.78	31.40	34.16	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	1.60	0.00	0.00	0.00
98	B	36.34	29.03	31.54	0.00	0.00	0.29	0.00	0.00	2.81	0.00	0.00	0.00
103	D	32.57	33.54	31.83	0.00	0.00	0.18	0.00	0.00	1.88	0.00	0.00	0.00

Capítulo I

106	B	35.85	28.78	32.30	0.00	0.00	0.07	0.05	0.00	2.89	0.00	0.00	0.07
122	D	36.57	28.97	31.62	0.15	0.00	0.26	0.00	0.00	2.42	0.00	0.00	0.00
124	D	35.08	29.29	33.03	0.17	0.00	0.49	0.00	0.00	1.93	0.00	0.01	0.00
135	B	34.49	30.39	33.06	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00	1.91	0.00	0.00	0.00
139	D	35.62	32.14	29.82	0.00	0.00	0.77	0.00	0.00	1.65	0.00	0.00	0.00
158	B	40.68	24.87	28.56	0.00	0.00	0.77	0.07	0.00	5.04	0.00	0.00	0.00
192	B	35.78	28.35	33.26	0.14	0.00	0.20	0.03	0.00	2.16	0.00	0.02	0.06
196	D	31.93	35.23	30.49	0.00	0.08	1.56	0.00	0.00	0.71	0.00	0.00	0.00
210	D	36.27	29.33	31.44	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00	2.87	0.00	0.00	0.00
282	D	33.22	33.39	31.70	0.00	0.00	0.68	0.00	0.00	1.01	0.00	0.00	0.00
351	D	37.08	30.24	30.71	0.00	0.00	0.12	0.00	0.00	1.84	0.00	0.00	0.00
368	D	36.93	27.31	31.60	0.27	0.11	0.48	0.00	0.00	2.79	0.25	0.10	0.15
413	D	37.46	17.07	40.98	1.30	0.18	0.12	0.07	0.25	1.68	0.00	0.27	0.62
501	D	37.99	27.97	30.76	0.00	0.00	0.18	0.05	0.00	3.04	0.00	0.00	0.00
576	D	51.51	9.07	32.01	0.00	0.00	4.86	0.00	0.00	2.55	0.00	0.00	0.00
577	D	46.63	21.78	23.41	0.00	0.14	1.39	0.12	0.13	6.40	0.00	0.00	0.00
586	B	36.49	29.17	31.91	0.12	0.00	0.13	0.00	0.00	2.18	0.00	0.00	0.00
77	B	38.32	26.88	31.40	0.00	0.00	0.17	0.00	0.00	3.24	0.00	0.00	0.00
78	B	36.19	30.66	30.03	0.00	0.00	1.50	0.00	0.00	1.61	0.00	0.00	0.00
86	B	34.44	30.10	33.13	0.00	0.00	0.47	0.04	0.00	1.81	0.00	0.00	0.00
87	D	35.25	30.36	32.00	0.00	0.00	0.35	0.00	0.00	2.04	0.00	0.00	0.00
95	D	35.52	28.46	33.78	0.00	0.00	0.31	0.00	0.00	1.92	0.00	0.00	0.00
100	D	42.34	21.37	22.78	0.00	0.17	7.83	0.12	0.00	5.39	0.00	0.00	0.00
102	D	32.67	33.28	31.87	0.00	0.00	1.37	0.00	0.00	0.81	0.00	0.00	0.00
112	B	40.46	22.89	33.90	0.00	0.13	1.55	0.09	0.00	0.98	0.00	0.00	0.00
114	D	32.81	30.66	35.01	0.00	0.00	0.39	0.00	0.00	1.13	0.00	0.00	0.00
156	B	39.58	25.77	30.02	0.00	0.00	0.20	0.00	0.00	4.31	0.00	0.00	0.13
170	D	42.42	23.28	28.43	0.00	0.00	0.30	0.08	0.00	5.48	0.00	0.00	0.00
184	D	42.35	22.02	28.14	0.00	0.00	0.28	0.10	0.00	6.92	0.00	0.00	0.19
280	B	36.97	26.11	33.32	0.00	0.00	0.33	0.00	0.00	3.28	0.00	0.00	0.00
363	B	42.73	22.72	29.52	0.09	0.00	0.18	0.07	0.00	4.43	0.00	0.15	0.11
76	D	43.24	23.73	27.76	0.00	0.00	0.30	0.00	0.00	4.85	0.00	0.00	0.12
83	D	39.50	25.17	29.62	0.17	0.00	0.28	0.07	0.00	4.96	0.17	0.06	0.00
238	D	35.97	28.32	32.06	0.17	0.00	0.20	0.00	0.00	3.28	0.00	0.00	0.00
259	D	40.19	24.23	29.79	0.27	0.00	0.23	0.08	0.00	5.05	0.06	0.03	0.08
266	B	36.10	26.12	33.68	0.23	0.00	0.12	0.00	0.00	3.41	0.14	0.19	0.00
278	D	38.27	25.23	31.05	0.26	0.00	0.30	0.10	0.00	4.79	0.00	0.00	0.00
297	D	39.14	24.72	31.48	0.00	0.00	0.26	0.00	0.00	4.40	0.00	0.00	0.00
326	D	42.52	23.84	29.85	0.00	0.00	0.36	0.00	0.00	3.23	0.00	0.00	0.20
340	B	41.07	23.85	28.68	0.11	0.00	0.30	0.00	0.00	6.00	0.00	0.00	0.00
342	D	38.93	25.50	31.15	0.00	0.00	0.21	0.06	0.00	4.15	0.00	0.00	0.00
441	B	40.47	25.14	28.27	0.00	0.00	0.30	0.08	0.00	5.60	0.00	0.00	0.14
458	D	42.52	23.04	26.94	0.21	0.13	1.39	0.09	0.00	5.32	0.37	0.00	0.00
599	B	39.83	25.20	29.14	0.00	0.00	0.28	0.00	0.00	5.34	0.00	0.00	0.21
600	B	43.65	18.03	27.00	0.28	0.34	3.70	0.14	0.00	4.78	0.74	0.59	0.75
601	B	40.03	24.97	29.65	0.18	0.07	0.27	0.08	0.00	4.45	0.12	0.16	0.00
121	B	52.71	17.73	23.62	0.43	0.05	0.21	0.09	0.00	4.40	0.40	0.26	0.09
Total		38.56	26.41	30.74	0.08	0.02	0.67	0.08	0.01	3.34	0.04	0.04	0.06
media±DT		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		4.16	4.53	2.89	0.19	0.06	1.27	0.04	0.04	1.58	0.13	0.10	0.14

WT%: porcentaje peso, Con.: consistencia ungueal, C: carbono, N: nitrógeno, O: oxígeno, Na: sodio, Mg: magnesio, Al: aluminio, Si: silicio, P: fósforo, S: azufre, Cl: cloruro, K: potasio, Ca: calcio, D: dura, B: blanda, DT: desviación típica.

Al comparar la proporción de cada elemento entre las capas dorsal, intermedia y ventral se encontraron diferencias significativas en los valores de WT% de los elementos carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y calcio (p -valores ≤ 0.01), si bien las capas relacionadas variaban en función del elemento analizado. Para el resto de los elementos no se encontraron diferencias significativas (p -valores > 0.104) (Tabla 6).

Tabla 6. Comparaciones del valor de WT% de los distintos elementos entre capas.

ELEMENTO	DORSAL-INTERMEDIA		DORSAL-VENTRAL		INTERMEDIA-VENTRAL	
	FRIEDMAN (p-valor)		TUKEY (p-valor)			
Carbono	<0.001*	<0.001*	<0.001*			0.909
Nitrógeno	<0.001*	0.275	<0.001*			<0.001*
Fósforo	0.01*	0.174	0.161			0.606
Azufre	<0.001*	<0.001*	0.708			<0.001*
Calcio	<0.001*	<0.001*	<0.001*			0.013

*: Diferencia significativa.

De las comparaciones realizadas en todas las variables consideradas con respecto a la consistencia, se detectaron diferencias significativas en los elementos calcio y magnesio (p-valores<0.039) e indicios de significación en el potasio (p-valor=0.052).

Por todo lo anterior, se realizó una regresión logística binaria para evaluar el efecto del género, ser fumador, edad, IMC, grosor y valores de WT% por capas y elementos sobre la consistencia. El modelo obtenido con tres pasos se ajusta a lo observado (p-valor=0.538 en la Prueba de Hosmer y Lemeshow con R2 de Nagelkerke=0.355) y es útil para predecir la consistencia (Aguayo Canela, 2007) (p-valor=0.001 en la prueba Ómnibus, con un 75.4% de casos clasificados correctamente). De todas las variables predictoras analizadas, solamente el calcio de la capa dorsal fue estadísticamente significativo, con coeficiente negativo (tiende a ser mayor en uñas de consistencia dura que en blandas) e igual a -6.226 (p-valor=0.006). Asimismo, se detectó indicio de significación para el magnesio en la capa intermedia y el potasio en la capa ventral, con coeficientes positivos (tiende a ser mayor en uñas de consistencia blanda que en duras) e iguales a 25.916 y 6.873, respectivamente (p-valores=0.058 y 0.089) (Tabla 7). El valor de la constante del modelo fue de 0.338. Por tanto, la ecuación para el modelo predictivo de la consistencia ungueal obtenido mediante regresión logística binaria fue:

$$\text{logit}(p)=0.338-6.226\text{Ca}_d+25.916\text{Mg}_i+6.873\text{K}_v$$

donde $\text{logit}(p)= p/(1-p)$, siendo Ca_d : el nivel de calcio de la capa dorsal, Mg_i : el nivel de magnesio de la capa intermedia, K_v : el nivel de potasio de la capa ventral y p : la probabilidad predictiva para las uñas de consistencia blanda. En resumen, valores

predictivos ≤ 0.5 se corresponden con uñas de consistencia dura y valores predictivos > 0.5 se corresponden con uñas de consistencia blanda.

Tabla 7. Valores de WT% para las tres variable predictoras del modelo.

CAPA	CONSISTENCIA	WT% CALCIO (DT)	WT% MAGNESIO (DT)	WT% POTASIO (DT)
DORSAL	D	0.32 (± 0.26)	0.02 (± 0.08)	0.08 (± 0.23)
	B	0.16 (± 0.15)	0.04 (± 0.06)	0.07 (± 0.09)
INTERMEDIA	D	0.07 (± 0.09)	0.01 (± 0.02)	0.04 (± 0.07)
	B	0.10 (± 0.09)	0.03 (± 0.04)	0.07 (± 0.08)
VENTRAL	D	0.05 (± 0.12)	0.02 (± 0.05)	0.02 (± 0.06)
	B	0.07 (± 0.16)	0.02 (± 0.07)	0.06 (± 0.13)

WT%: porcentaje peso, DT: desviación típica; D: dura; B: blanda.

DISCUSIÓN

Los cuatro elementos mayoritarios encontrados: carbono, oxígeno, nitrógeno y azufre, respaldan los resultados obtenidos en trabajos previos (Pinteala *et al.*, 2016; Laubé *et al.*, 2019), a pesar de que los análisis elementales se realizaron únicamente en la superficie dorsal de las láminas ungueales, en lugar de por capas a lo largo del plano transversal (obtenido con la herramienta de corte), como se ha realizado en este trabajo. Otros factores que tampoco parecen influir a la hora de determinar la presencia de los cuatro elementos mayoritarios en las láminas ungueales son: que la técnica empleada sea el análisis a lo largo de un segmento o un análisis puntual sobre un área concreta, que las muestras sean uñas sanas de manos o uñas sanas de pies o que la edad de los participantes sea distinta (Robson y Brooks, 1974; Pinteala *et al.*, 2016; Laubé *et al.*, 2019).

Sin embargo, el análisis por capas realizado permite profundizar en el estudio y establecer diferencias entre ellas. De hecho, todos los elementos mayoritarios excepto el oxígeno, han mostrado diferencias en su distribución en función de la capa analizada, e incluso, dos de los elementos minoritarios, el calcio y el fósforo. Los puentes disulfuro presentes en la capa dorsal parecen ser más estables que los enlaces presentes en el resto de las capas (Baraldi *et al.*, 2015), lo que mantendría firmemente unidos los filamentos de queratina de la capa más externa y expuesta a posibles agresiones. Este hecho, junto con el mayor nivel de azufre detectado en la capa dorsal y ventral podrían ser consecuencia de la disposición al azar que adquieren los filamentos de queratina en

ambas capas. Esta disposición aleatoria requeriría de un mayor número de enlaces muy estables para mantener la integridad de la estructura, por lo que sería necesario un mayor número de residuos de cisteína que permitiera mantener la cohesión en el interior de unas capas que, además cuentan con un menor grosor (Runne y Orfanos, 1981; Kobayachi *et al.*, 1999).

El calcio y el magnesio son dos cationes divalentes que se encuentran asociados con frecuencia en los seres vivos al participar en importantes funciones biológicas (Shigeki *et al.*, 2005). Normalmente, sus metabolismos están relacionados y son componentes fundamentales de tejidos tan importantes como el tejido óseo. Por eso no resulta sorprendente que, de entre todas las variables analizadas para determinar la consistencia ungueal, estos dos elementos mostraran diferencias significativas. Sin embargo, la principal variable predictiva en el cálculo del modelo predictivo de la consistencia ungueal fue el nivel de calcio de la capa dorsal, tanto en el grupo de los jóvenes como en el grupo de los adultos. En este sentido, estudios previos han demostrado que la concentración de calcio en las uñas de los pies disminuye significativamente con la edad, tanto en hombres como en mujeres (Shigeki *et al.*, 2005). No obstante, el modelo desarrollado no se vio afectado en el grupo de mayor edad (adultos) y la variable nivel de calcio en la capa dorsal continuó siendo la principal variable predictiva en este grupo de edad.

Al estudiar los niveles de calcio se detectó que la capa dorsal era la que mayor concentración presentaba, en consonancia con trabajos ya publicados (Robson y Brooks, 1974). Por otro lado, los estudios de la dureza al corte mediante la prueba de corte con tijera en cada una de las capas de forma aislada no mostraron diferencias entre la resistencia al corte de la capa dorsal y ventral (Farren *et al.*, 2004). Por tanto, no parece que el mayor nivel de calcio en la capa dorsal dote a esta capa de mayor dureza frente al corte. Sorprendentemente, sí está relacionado con las uñas de consistencia dura puesto que el nivel de calcio en la capa dorsal se ha identificado como la principal variable predictora del modelo, permitiendo identificar las uñas de consistencia dura como aquellas con un mayor porcentaje de calcio en la capa dorsal, y todo ello a pesar de que sus concentraciones fueron muy bajas (inferiores al 0.50% de media) en

comparación con las de otros elementos mayoritarios, que no han demostrado tener valor predictivo en la determinación de la consistencia ungueal.

Parece lógico pensar que la gran compactación descrita en las células de la capa dorsal (de Berker, Mawhinney, *et al.*, 1996) podría estar relacionada con una mayor densidad de desmosomas que interconecten fuertemente las células entre sí, aunque estas estructuras de unión se han identificado en todas las capas de la lámina ungueal (Caputo *et al.*, 1982; Parent *et al.*, 1985). Además, la proteína mayoritariamente aislada en extractos proteicos de uña es la proteína DSP, una desmoplaquina involucrada en la formación de desmosomas (Rice *et al.*, 2010). Otra familia de proteínas presentes en los desmosomas son las cadherinas dependientes de calcio (Frank *et al.*, 2001) cuya función de adhesión está regulada por la presencia de este catión. A la vista de lo expuesto, el mayor nivel de calcio en la capa dorsal en comparación con el resto de las capas podría explicarse por la mayor presencia de proteínas dependientes de calcio propias de estructuras de unión célula-célula.

Cabe destacar que ninguno de los elementos mayoritarios analizados parece ser clave en la determinación de la consistencia ungueal, al menos con el modelo predictivo desarrollado, a pesar de haberse establecido diferencias en el análisis elemental de cada capa. Tampoco el grosor de la lámina ha resultado ser una variable predictora válida de la consistencia, tal y como se describió en trabajos previos (Pérez Pico *et al.*, 2017), pese a que pensamos que la metodología empleada para su medición en este trabajo es más sensible que los micrómetros comúnmente empleados (Young *et al.*, 1965; Langford *et al.*, 1989; Johnson y Shuster, 1994; de Berker, Mawhinney, *et al.*, 1996; Kobayachi *et al.*, 1999). En concreto, los valores de grosor medidos en este trabajo son menores que los obtenidos en estudios previos (de Berker, Mawhinney, *et al.*, 1996; Baraldi *et al.*, 2015). Consideramos que la diferencia en el abordaje metodológico es un factor fundamental que probablemente haya influido en esta observación. En este sentido, el uso del análisis mediante imágenes sobre las muestras *ex vivo* podría haber reducido las posibles fuentes de variabilidad presentes durante las mediciones del grosor *in vivo* (Langford *et al.*, 1989). Además, el tratamiento previo con ultrasonidos de las muestras destinado a eliminar los posibles residuos subungueales que no forman parte de la estructura propia de la lámina ungueal puede haber repercutido en la obtención de medidas de grosores

inferiores que las obtenidas en otros estudios, en los que no se especifica el tipo de tratamiento previo (de Berker, Mawhinney, *et al.*, 1996). El género es otra de las variables analizadas que no fue útil para predecir la consistencia ungueal. Sin embargo, estudios previos establecieron diferencias en el contenido aminoacídico de las queratinas presentes en las láminas ungueales de hombres y de mujeres, así como en el número de enlaces disulfuro, en el número de dominios en hélice α , hojas plegadas β y espirales al azar (Brzózka y Kolodziejcki, 2017).

El modelo predictivo presentado avala trabajos previos de determinación de la consistencia ungueal *in vivo* (Pérez Pico *et al.*, 2017; Pérez Pico *et al.*, 2019) y supone una herramienta novedosa y útil para su determinación de forma objetiva. Además, al desarrollarse sobre láminas ungueales sanas, permite establecer los valores saludables de consistencia en cada individuo e identificar las posibles desviaciones consecuencia de diversos estados patológicos que alteren las características de éstas. Por tanto, esta nueva metodología desarrollada podría tener valor predictivo en la aparición de estados patológicos y contribuiría a agilizar y facilitar el diagnóstico preventivo de determinadas patologías sistémicas y ungueales con repercusión a nivel de consistencia ungueal.

CONCLUSIONES

1. La técnica SEM-EDS permitió determinar la composición elemental en cada capa de la lámina ungueal. Si bien no todos los elementos estuvieron presentes en todas las capas.
2. La composición elemental varió entre capas en el caso de 5 elementos químicos, aunque la relación entre las capas dependió del elemento analizado.
3. La composición elemental sólo se relacionó con la consistencia ungueal en el caso de 3 variables: el calcio de la capa dorsal, el magnesio en la capa intermedia y el potasio en la capa ventral.
4. El modelo matemático desarrollado mediante regresión logística binaria a partir de 3 de las variables de composición elemental analizadas es útil para predecir la consistencia ungueal acertando en un 75.4% de casos analizados.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguayo Canela, M.** (2007). Cómo hacer una Regresión Logística con SPSS "paso a paso" (I). *fabis*, 1-16.
- Baraldi, A., Jones, S. A., Guesne, S., Traynor, M. J., McAuley, W. J., Brown, M. B. y Murdan, S.** (2015). Human nail plate modifications induced by onychomycosis: implications for topical therapy. *Pharm Res*, 32(5), 1626-1633. doi:<https://doi.org/10.1007/s11095-014-1562-5>
- Brzózka, P. y Kolodziejski, W.** (2017). Sex-related chemical differences in keratin from fingernail plates: a solid-state carbon-13 NMR study. *RSC Adv*, 7, 28213-28223. doi:<https://doi.org/10.1039/c7ra03487c>
- Caldas, L. A., Carneiro, F. A., Higa, L. M., Monteiro, F. L., da Silva, G. P., da Costa, L. J., Durigon, E. L., Tanuri, A. y de Souza, W.** (2020). Ultrastructural analysis of SARS-CoV-2 interactions with the host cell via high resolution scanning electron microscopy. *Sci Rep*, 10(1), 16099. doi:<http://doi.org/10.1038/s41598-020-73162-5>
- Caputo, R., Gasparini, G. y Contini, D.** (1982). A freeze-fracture study of the human nail plate. *Arch Dermatol Res*, 272(1-2), 117-125. doi:<https://doi.org/10.1007/bf00510401>
- de Berker, D., Mawhinney, B. y Sviland, L.** (1996). Quantification of regional matrix nail production. *Br J Dermatol*, 134(6), 1083-1086. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1996.d01-906.x>
- Farren, L., Shayler, S. y Ennos, A. R.** (2004). The fracture properties and mechanical design of human fingernails. *J Exp Biol*, 207(Pt 5), 735-741. doi:<https://doi.org/10.1242/jeb.00814>
- Fernandez-Segura, E. y Warley, A.** (2008). Electron Probe X-ray Microanalysis for the Study of Cell Physiology. In T. Allen (Ed.), *Introduction to Electron Microscopy for Biologists* (1st Edition ed., Vol. 88, pp. 1-545). United States: Academic Press.
- Frank, J., Cserhalmi-Friedman, P. B., Ahmad, W., Panteleyev, A. A., Aita, V. M. y Christiano, A. M.** (2001). Characterization of the desmosomal cadherin gene family: genomic organization of two desmoglein genes on human chromosome 18q12. *Exp Dermatol*, 10(2), 90-94. doi:<https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2001.010002090.x>
- Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Echlin, P., Joy, D. C., Lyman, C. E., Lifshin, E., Sawyer, L. y J.R., M.** (2003). *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis* (Springer Ed. Third Edition ed.).
- Harris, J. R.** (2015). Transmission electron microscopy in molecular structural biology: A historical survey. *Arch Biochem Biophys*, 581, 3-18. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.11.011>
- Johnson, M. y Shuster, S.** (1994). Determinants of nail thickness and length. *Br J Dermatol*, 130(2), 195-198. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1994.tb02899.x>
- Kobayashi, Y., Miyamoto, M., Sugibayashi, K. y Morimoto, Y.** (1999). Drug Permeation through the Three Layers of the Human Nail Plate. *J Pharm Pharmacol*, 51(3), 271-278. doi:<https://doi.org/10.1211/0022357991772448>
- Langford, D. T., Burke, C. y Robertson, K.** (1989). Risk factors in onychocryptosis. *Br J Surg*, 76(1), 45-48. doi:<https://doi.org/10.1002/bjs.1800760114>
- Laubé, F., Poupon, A., Zinck, P., Müller-Goymann, C., Reichl, S. y Nardello-Rataj, V.** (2019). Physicochemical investigations of native nails and synthetic models for a better understanding of surface adhesion of nail lacquers. *Eur J Pharm Sci*, 131(January), 208-217. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.02.014>
- Luklanoff, G. V.** (1987). History of scanning electron beam testing development. *Microelectronic Engineering*, 7(2-4), 115-129. doi:[http://doi.org/doi:10.1016/s0167-9317\(87\)80003-5](http://doi.org/doi:10.1016/s0167-9317(87)80003-5)
- Mingyou, X., Jie, L., Jiayi, S., Xinrong, X., Yongcheng, H. y Bin, L.** (2020). Optical Microscopy and Electron Microscopy for the Morphological Evaluation of Tendons: A Mini Review. *Orthop Surg*, 12(2), 366-371. doi:<http://doi.org/10.1111/os.12637>

- Newbury, D. E. y Ritchie, N. W.** (2015). Performing elemental microanalysis with high accuracy and high precision by scanning electron microscopy/silicon drift detector energy-dispersive X-ray spectrometry (SEM/SDD-EDS). *J Mater Sci*, 50(2), 493-518. doi:<http://doi.org/10.1007/s10853-014-8685-2>
- Parent, D., Achten, G. y Stouffs-Vanhoof, F.** (1985). Ultrastructure of the normal human nail. *Am J Dermatopathol*, 7(6), 529-535. doi:<https://doi.org/10.1097/00000372-198512000-00004>
- Pérez Pico, A. M., Mingorance Álvarez, E., Caballé Cervigón, N. y Mayordomo Acevedo, R.** (2019). Importance of Preexisting Physical Factors in the Development of Dermatological and Muscular Lesions During Hiking. *Int J Low Extrem Wounds*, 18(2), 161-170. doi:<https://doi.org/10.1177/1534734619845600>
- Pérez Pico, A. M., Verjano, E. y Mayordomo, R.** (2017). Relation between nail consistency and incidence of ingrown toenails in young male runners. *J Am Podiatr Med Assoc*, 107(2), 137-143. doi:<https://doi.org/10.7547/15-121>
- Pinteala, T., Chiriac, A. E., Rosca, I., Larese Filon, F., Pinteala, M., Chiriac, A., Podoleanu, C., Stolnicu, S., Coros, M. F. y Coroaba, A.** (2016). Nail damage (severe onychodystrophy) induced by acrylate glue: scanning electron microscopy and energy dispersive x-ray investigations. *Skin Appendage Disord*, 2(3-4), 137-142. doi:<https://doi.org/10.1159/000450791>
- Rice, R. H., Xia, Y., Alvarado, R. J. y Phinney, B. S.** (2010). Proteomic analysis of human nail plate. *J Proteome Res*, 9(12), 6752-6758. doi:<https://doi.org/10.1021/pr1009349>
- Robson, J. R. K. y Brooks, G. J.** (1974). The distribution of calcium in fingernails from healthy and malnourished children. *Clin Chim Acta*, 55(2), 255-257. doi:[https://doi.org/10.1016/0009-8981\(74\)90302-7](https://doi.org/10.1016/0009-8981(74)90302-7)
- Rogers, M. A., Langbein, L., Praetzel-Wunder, S., Winter, H. y Schweizer, J.** (2006). Human hair keratin-associated proteins (KAPs). *Int Rev Cytol*, 251, 209-263. doi:[http://doi.org/10.1016/S0074-7696\(06\)51006-X](http://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)51006-X)
- Runne, U. y Orfanos, C. E.** (1981). The human nail. Structure, growth and pathological changes. *Curr. Probl. Derm.*, 9, 102-149. doi:<https://doi.org/10.1159/000403346>
- Samuleson, D. A.** (1998). Energy dispersive X-ray microanalysis. In D. Armstrong (Ed.), *Methods in Molecular Biology. Free radical and antioxidant protocols*. (Vol. 108, pp. 413-424). New Jersey: Humana Press.
- Scimeca, M., Bischetti, S., Lamsira, H. K., Bonfiglio, R. y Bonanno, E.** (2018). Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis. *Eur J Histochem*, 62(1), 2841. doi:<http://doi.org/10.4081/ejh.2018.2841>
- Shigeki, O., Takuo, F., Yoshio, F., Chiyo, H. y Hisahide, N.** (2005). Nail calcium and magnesium content in relation to age and bone mineral density. *J Bone Miner Metab*, 23, 318-322. doi:<https://doi.org/10.1007/s00774-005-0606-7>
- Strnad, P., Usachov, V., Debes, C., Gräter, F., Parry, D. A. D. y Bishr Omary, M.** (2011). Unique amino acid signatures that are evolutionarily conserved distinguish simple-type, epidermal and hair keratins. *J Cell Sci*, 124(24), 4221-4232. doi:<https://doi.org/10.1242/jcs.089516>
- Takaku, Y., Takehara, S., Suzuki, C., Suzuki, H., Shimomura, M. y Hariyama, T.** (2020). In situ elemental analyses of living biological specimens using 'NanoSuit' and EDS methods in FE-SEM. *Sci Rep*, 10(1), 14574. doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-020-71523-8>
- Wang, B., Yang, W., McKittrick, J. y A, M. M.** (2016). Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science*, 76, 229-318. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.06.001>
- Young, R. W., Newman, S. B. y Capott, R. J.** (1965). Strength of Fingernails. *J Invest Dermatol*, 44, 358-360. doi:<https://doi.org/10.1038/jid.1965.64>



Capítulo II

Cuantificación y análisis de la expresión diferencial de dos queratinas de tipo I como factores determinantes de la consistencia ungueal

INTRODUCCIÓN

Bajo el nombre genérico de queratinas, se pueden designar varios conceptos diferentes: los monómeros de proteínas formadoras de filamentos de queratina, varios tipos distintos de filamentos de queratina y también se puede hacer referencia con este nombre al conjunto formado por los filamentos de queratina junto con la matriz celular proteica rica en KAP, ambas asociadas para formar un complejo andamiaje citoplasmático. Las queratinas son el FI característico de los tejidos epiteliales y sus derivados cutáneos, e incluye las clases tipo I y II de la clasificación de los FI (Sanghvi-Shah y Weber, 2017).

Queratinas: FI de tipo I y II

Existen distintos criterios para clasificar a las queratinas: atendiendo a su localización y patrón de expresión (Moll, R. *et al.*, 1982; Heid *et al.*, 1988; Moll, I. *et al.*, 1988; Langbein *et al.*, 1999; Sanghvi-Shah y Weber, 2017), atendiendo a su estructura tridimensional (Fraser *et al.*, 1959; Fraser y Parry, 2009) y atendiendo a sus características bioquímicas (Moll, R. *et al.*, 1982; Rice *et al.*, 2010), entre otras posibles clasificaciones. Tradicionalmente, las queratinas se han denominado duras o blandas dependiendo del tejido en el que se localizaran. Así, las queratinas duras, también denominadas tricoqueratinas o queratinas de pelo son aquellas queratinas presentes en los anejos cutáneos como el pelo y la uña, mientras que las queratinas blandas, también denominadas citoqueratinas o queratinas epiteliales son las presentes en el resto de los epitelios.

Otro de los de los criterios más extendidos de clasificación de las queratinas, se basa en las características bioquímicas de los aminoácidos que componen su estructura primaria, lo que determina el punto isoeléctrico de la proteína (Moll, R. *et al.*, 1982; Moll, I. *et al.*, 1988). Bajo este criterio, las queratinas se clasifican en los tipos I o II. En la clase de las queratinas de tipo I se encuentran aquellas queratinas en cuya secuencia abundan los aminoácidos básicos o neutros, con puntos isoeléctricos que oscilan entre 4.9 y 5.4, mientras que en la clase de las queratinas de tipo II se encuentran las queratinas cuya secuencia es rica en aminoácidos de tipo ácido, con puntos isoeléctricos en torno a 6.5 y 8.5 (Bowden *et al.*, 1984). En el caso de las queratinas presentes en la

lámina ungueal, los puntos isoeléctricos varían entre 4.9 y 5.4 (Marshall, 1983), coincidiendo con los valores descritos para las queratinas del tipo I, aunque es importante recordar en este punto, que los filamentos de queratina son heterodímeros obligados por lo que siempre contienen una queratina de tipo I y otra de tipo II en sus dímeros (Eichner *et al.*, 1986; Hatzfeld y Weber, 1990; Miller *et al.*, 1993). Otra característica bioquímica propia de las queratinas es su peso molecular, que en caso de las queratinas de humanos oscila entre los 40-70kDa, al igual que en el resto de los mamíferos (Bowden *et al.*, 1984).

Solubilización y desnaturalización de las queratinas

Los filamentos de queratina se mantienen internamente unidos entre sí y también covalentemente unidos a las KAP presentes en la matriz celular (Rogers *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2012) mediante el establecimiento de los puentes disulfuro entre aminoácidos azufrados (Steinert *et al.*, 1976), especialmente residuos de cisteína muy numerosos en el caso de las queratinas de pelo (Lynch *et al.*, 1986) y KAP (Wiedemann *et al.*, 2020). El resultado de la unión mediante un puente disulfuro entre dos aminoácidos de cisteína próximos se denomina cistina y contribuye a otorgar las características fisicoquímicas propias de las queratinas (Steinert *et al.*, 1984). La formación de este enlace consiste en la oxidación de los dos grupos sulfhidrilo reducidos de dos cisteínas próximas para obtener una cistina oxidada (Figura 11).

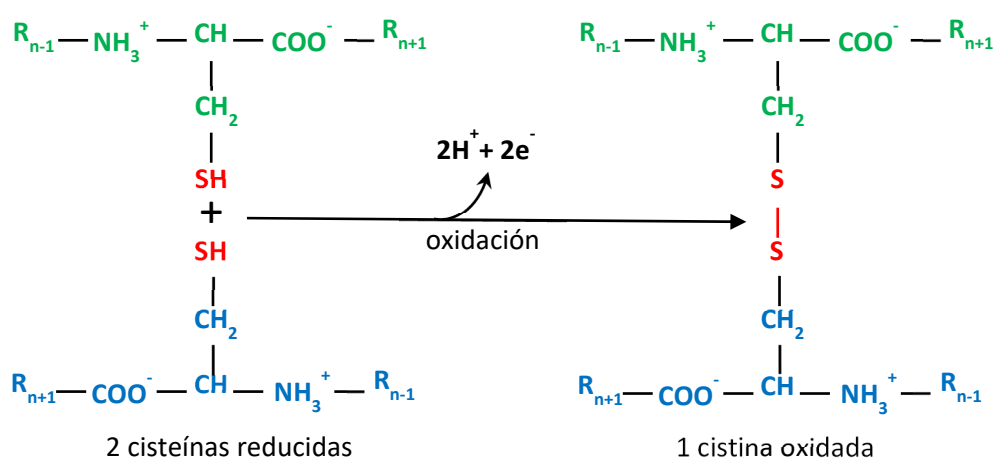


Figura 11. Ilustración esquemática de la formación de una cistina mediante el establecimiento de un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína cercanos pero pertenecientes a dos cadenas polipeptídicas diferentes.

Para poder extraer las queratinas presentes en los tejidos es necesario solubilizarlas y liberarlas del complejo andamiaje celular en el que se asocian. Para ello, tradicionalmente se han empleado diferentes agentes reductores, como por ejemplo el tioglicolato, el ditiotreitól o el 2-mercaptoetanol (Gillespie y Lennox, 1955; Weigmann, 1968; Kitahara y Ogawa, 1991). Estos compuestos químicos permiten romper los puentes disulfuro, eliminando la estructura cuaternaria de los complejos proteicos. Para lograr la completa desnaturalización de las queratinas e incrementar así su solubilidad en soluciones acuosas, además de los agentes reductores ya mencionados, se han empleado tampones con distinta concentración de urea, normalmente entre 8M (Steinert *et al.*, 1976; Marshall, 1983) y 9M (Kitahara y Ogawa, 1991), manteniendo el rango de pH de los tampones de extracción entre 7 (Steinert *et al.*, 1976) y 9.3 (Marshall, 1983).

Patrones de expresión de queratinas en el aparato ungueal

Debido al creciente descubrimiento de nuevas queratinas, especialmente impulsado por su interés como marcadores tumorales, los sistemas de clasificación se han ido adaptando para adecuarse a las nuevas necesidades. El último consenso sobre la nomenclatura de las queratinas en mamíferos (Schweizer *et al.*, 2006) está además en consonancia con las indicaciones realizadas por la Organización Genoma Humano (HUGO) para la nomenclatura de genes y de proteínas. En esta clasificación se puede observar que dentro del grupo de queratinas de tipo I y de tipo II, se encuentran tanto queratinas epiteliales como queratinas de pelo humanas.

La disponibilidad de una amplia y diversa evidencia científica ha permitido caracterizar los patrones de expresión de las queratinas epiteliales y de pelo en los diferentes elementos que conforman el aparato ungueal, especialmente en el pliegue proximal, en la matriz ungueal y en el lecho ungueal (Baden y Kubilus, 1984; Heid *et al.*, 1988; Moll, I. *et al.*, 1988; Westgate *et al.*, 1997; Waseem *et al.*, 1999; de Berker *et al.*, 2000; McGowan y Coulombe, 2000; Perrin *et al.*, 2004; Perrin, 2007; Perrin *et al.*, 2011) (Tabla 8). Además, trabajos previos basados en la extracción de queratinas y en el análisis de los inmunoblots han permitido detectar la presencia de ambos tipos de queratinas en la lámina ungueal: queratinas epiteliales y de pelo (Lynch *et al.*, 1986; Heid

et al., 1988; Kitahara y Ogawa, 1991). Sin embargo, los análisis de cuantificación de las queratinas pusieron de manifiesto que, la mayoría de las queratinas detectadas en la lámina se corresponden con queratinas de pelo frente a las queratinas epiteliales que sólo representan el 10-20% de las queratinas totales presentes en la lámina ungueal (Lynch *et al.*, 1986; Heid *et al.*, 1988).

Tabla 8. Expresión de queratinas en láminas ungueales procedentes de fetos, niños y adultos.

	Tipo I		Tipo II	
	Epitelial	De pelo	Epitelial	De pelo
Pliegue proximal	K10, K13, K14, K15, K16, K17, K19	K31, K32, K33, K34, K36	K1, K6	K81, K82, K83, K84
Eponiquio	K10, K13, K14, K16, K17	nd	K5, K6	nd
Matriz	K10, K13, K14, K15, K16, K17, K18, K19	K31, K32, K33, K34, K36, K38	K1, K5, K6, K7, K8,	K81, K82, K83, K84, K85, K86
Lecho ungueal	K10, K14, K16, K17, K19	K31, K32, K33, K34, K36	K5, K6, K7, K75	K81, K82, K83, K84
Lámina ungueal	K10, K13, K14, K16, K17, K19	K31, K32, K33, K34, K36	K5, K6	K81, K82, K83, K84
Hiponiquio	K10, K13, K14, K16, K17, K19	K36	K5	nd
Pulpejo	K16, K17	nd	K6	nd

Estudios consultados para la realización de la tabla (Baden y Kubilus, 1984; Heid *et al.*, 1988; Moll, I. *et al.*, 1988; Westgate *et al.*, 1997; Waseem *et al.*, 1999; de Berker *et al.*, 2000; McGowan y Coulombe, 2000; Perrin *et al.*, 2004; Perrin, 2007; Perrin *et al.*, 2011). K: queratina, nd: dato no disponible.

OBJETIVOS

1. Evaluar la viabilidad de un estudio inmunohistoquímico comparado entre las diferentes capas que componen las láminas ungueales.
2. Analizar los rendimientos de extracción de proteínas totales de láminas ungueales con distinta consistencia ungueal, bajo condiciones reductoras crecientes.
3. Analizar la posible relación entre el nivel de expresión de queratinas epiteliales y de pelo tipo I con la consistencia ungueal, en extractos proteicos de láminas ungueales obtenidos bajo condiciones reductoras crecientes mediante inmunoblot.
4. Analizar la posible relación entre el nivel de expresión de queratinas epiteliales y de pelo tipo I con la consistencia ungueal, directamente sobre el tejido utilizando cortes histológicos de láminas ungueales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Permisos, descripción de la muestra y criterios de inclusión

El presente trabajo contó con la autorización del Comité de Bioética de la Universidad de Extremadura (Nº Registro: 116/2016, Anexo I) y se ha desarrollado de acuerdo con los principios éticos establecidos en la Declaración de 1975 de Helsinki y sus revisiones posteriores. Todos los participantes firmaron un consentimiento previo a su participación.

La obtención de la información sanitaria necesaria se realizó mediante una exploración física de los pies y la cumplimentación de un cuestionario de salud (Anexo II). Los criterios de inclusión fueron: tener una edad comprendida entre los 40 y los 55 años, no haber sido diagnosticado de enfermedades que pudieran alterar la estructura y/o composición de la lámina ungueal, no tomar medicación que se haya descrito que altere la estructura y/o composición de la lámina ungueal, seguir una dieta mediterránea y no haber empleado esmaltes, lacas o cualquier otra sustancia sobre las láminas ungueales del primer dedo de los pies.

La muestra quedó compuesta por 32 individuos de edad adulta (49.81 ± 3.21 años), 16 hombres y 16 mujeres, de los cuales, 18 individuos (56.25%) presentaron uñas de consistencia dura y 14 individuos (43.75%) presentaron uñas de consistencia blanda (Tabla 9).

Tabla 9. Descripción de la muestra: edad, sexo y consistencia ungueal.

Muestra (ref.)	Edad	Sexo	Consistencia ungueal
15	54	hombre	dura
35	51	mujer	blanda
45	50	mujer	blanda
53	53	hombre	blanda
54	50	hombre	blanda
61	53	hombre	blanda
68	48	hombre	blanda
69	52	hombre	dura
70	48	mujer	blanda
98	45	mujer	blanda
104	47	mujer	dura
122	55	mujer	dura
134	51	mujer	dura

135	55	hombre	blanda
139	48	mujer	dura
140	50	mujer	dura
147	45	mujer	dura
150	54	hombre	blanda
151	46	mujer	dura
158	45	mujer	blanda
177	52	mujer	dura
181	48	mujer	dura
192	46	hombre	blanda
196	44	hombre	dura
210	54	hombre	dura
282	51	hombre	dura
293	48	mujer	blanda
315	51	hombre	dura
425	47	hombre	dura
501	49	hombre	dura
577	51	mujer	dura
586	53	hombre	blanda

Ref.: número de referencia.

Determinación de la consistencia ungueal y obtención de muestras

La determinación de la consistencia ungueal se realizó *in vivo* por personal especializado y entrenado. Se dejaron atemperar los pies y se aplicó presión manual sobre los bordes del aparato ungueal en los ejes dorso-ventral y lateral-medial tal y como se describe en protocolos previos del grupo de investigación (Pérez Pico *et al.*, 2017).

Las muestras fueron recogidas con un cortaúñas sobre el borde libre de la lámina del primer dedo del pie, sin alterar en ningún caso la integridad de la banda onicodérmica. Para eliminar las células muertas, fibras y otros posibles residuos acumulados bajo las láminas ungueales, se procedió a tratar las muestras por inmersión en baño de ultrasonidos (Ultrasonic LC60H, Elma, Alemania). Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su posterior análisis.

Anticuerpos

En la Tabla 10 se describen todos los anticuerpos empleados para la obtención de los resultados recogidos en el presente capítulo. El anticuerpo monoclonal AE13 fue proporcionado amablemente por el Dr. Sun, T-T (Universidad de Nueva York) y reconoce un par de bandas de 44-46 kDa de una queratina de pelo de tipo I (Lynch *et al.*, 1986). El anticuerpo citoqueratina 17 (CTK17) (sc-393091, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania) reconoce una banda de 46kDa correspondiente a una queratina epitelial de tipo I. El anticuerpo monoclonal frente a la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (sc-32233, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania) fue utilizado como control de carga en los inmunoblots en los que se analizaron muestras extraídas a 50mM de 2-mercaptoetanol. Finalmente, se utilizó un anticuerpo secundario de cabra frente a IgG de ratón (H+L) conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) de Advansta para revelar la presencia de señal (San José, California, Estados Unidos) en los inmunoblots y el anticuerpo secundario Alexa Fluor 568 de cabra anti-conejo IgG (H+L) para los ensayos inmunohistoquímicos (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA).

Tabla 10. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los análisis mediante inmunoblot e inmunohistoquímicos.

Anticuerpo	Procedencia	Casa comercial	Técnica	Dilución	Incubación
AE13	Ratón	Universidad de Nueva York	IB	1:500	4°C,
			IH	1:100	12-16h
CTK17	Ratón	Santa Cruz	IB	1:500	4°C,
			IH	1:100	12-16h
GAPDH	Ratón	Santa Cruz	IB	1:2000	4°C, 12-16h
IgG-HRP	Cabra	Thermo Scientific	IB	1:10000	T ^a amb., 1h
Alexa Flúor 568	Cabra	Invitrogen	IH	1:200	4°C, 12-16h

IB: inmunoblot, IH: inmunohistoquímica, °C: grados centígrados, h: horas, CTK17: citoqueratina 17.

Procedimiento de extracción, cuantificación de proteínas e inmunoblot

Las extracciones de queratinas se realizaron a partir de las muestras de lámina ungueal obtenidas, siguiendo la metodología ya descrita (Kitahara y Ogawa, 1991). Al ser un procedimiento de extracción secuencial en dos pasos, se utilizaron dos tampones

diferentes: tampón I (50mM Tris-HCl, 9M urea, 2mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo y 50mM 2-mercaptoetanol, pH 9) y tampón II (200mM Tris-HCl, 9M urea, 2mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo y 200mM 2-mercaptoetanol, pH 9). Por tanto, se obtuvieron dos extractos de cada muestra con concentraciones crecientes de 2-mercaptoetanol: uno a 50mM en el que las queratinas epiteliales se solubilizaron, y otro a 200mM, en el que las queratinas de pelo, más resistentes que las queratinas epiteliales, se solubilizaron (Kitahara y Ogawa, 1991). Se realizaron 3 repeticiones independientes del procedimiento de extracción con cada muestra analizada. La cuantificación de la concentración de proteína presente en los extractos se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976).

Debido a que el peso molecular de las queratinas diana era muy similar (44-46kDa: anticuerpo AE13; 46kDa: anticuerpo CTK17) fue necesario realizar inmunoblots independientes para cada anticuerpo. Se cargaron 3µg de proteína por pocillo en los inmunoblots para el anticuerpo AE13 y 10µg de proteína para el anticuerpo CTK17, con el objetivo de evitar problemas de saturación de la membrana y realizar la cuantificación dentro el rango lineal. Se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Los geles se prepararon al 10% de acrilamida y las electroforesis se desarrollaron en tampón de electroforesis (25mM Tris, 192mM glicina, 0.1% p/v SDS). Una vez separadas las proteínas, fueron transferidas electroforéticamente (40mV, durante 4h, a 4°C) a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare life sciences, Friburgo, Alemania) utilizando el sistema Mini Trans Blot System (Biorad Laboratories, Shanghai, China) con tampón de transferencia (25mM Tris, 192mM glicina, 20% v/v metanol).

Las membranas de nitrocelulosa fueron tratadas con solución de bloqueo (50mM Tris-HCl, 75mM NaCl, 0.2% (v/v) Tween-20, pH 7.5, con 10% (p/v) de leche desnatada) durante 2h a temperatura (T^a) ambiente. Posteriormente, se incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios: AE13 y CTK17 (diluidos 1:500 (v/v) en solución de bloqueo) y GAPDH (diluido 1:2000 (v/v) en solución de bloqueo) a 4°C. Puesto que las condiciones de extracción con el tampón II (200mM) son incompatibles con la extracción de la proteína GAPDH, se utilizó la tinción con Ponceau S como control de carga en lugar del anticuerpo GAPDH. A continuación, se realizaron tres lavados (solución salina

tamponada con Tris, pH 7.5, con 0.2% Tween-20) de 10 minutos cada uno, y se incubó con el anticuerpo secundario de cabra frente a IgG de ratón conjugado con HRP (diluido 1:10000 en solución de bloqueo) durante 1h a Tª ambiente. Después de lavar cuatro veces durante 10 minutos, se añadió el sustrato quimioluminiscente de HRP Pierce ELC (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, Estados Unidos) a las membranas con los anticuerpos AE13 and CTK17, y el sustrato más sensible Clarity Max (Biorad Laboratories, Segrate, Italia) a las membranas con el anticuerpo GAPDH. Finalmente, las membranas se expusieron a películas de rayos X Hyperfilm ELC (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido).

Procesamiento del tejido ungual y obtención de secciones

Para facilitar el seccionado de este tejido altamente queratinizado se desarrolló un protocolo histológico específico basado en el tratamiento previo de las muestras con un agente reductor (2-mercaptoetanol). Se procedió a testar distintos tiempos de preincubación: 5h, 12h o 24h con una muestra de uña de consistencia dura y otra muestra de uña de consistencia blanda en tampón II (200mM Tris-HCl, 9M urea, 2mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo y 200mM 2-mercaptoetanol, pH 9). Los resultados obtenidos mostraron que el tiempo de preincubación óptimo en tampón reductor, para facilitar el seccionado de las muestras, fue de 12h, incluso en las uñas de consistencia dura. Por tanto, todas las muestras se preincubaron en tampón reductor antes de ser incluidas en una solución de sacarosa-gelatina (sacarosa 15%, gelatina 15% en solución salina tamponada con Tris (TBS) 0.1 M pH 7.4).

Debido a las características propias del tejido, no fue necesario someter las muestras a procedimientos de fijación, pues se trata de un tejido altamente queratinizado en el que la mayoría de las células están muertas. Una vez solidificados los bloques de sacarosa-gelatina con las muestras incluidas, se embebieron en compuesto para el corte de temperatura óptimo (OTC) y se almacenaron a -80°C hasta su completa congelación. Una vez completamente endurecidas las muestras se obtuvieron secciones de 20µm de grosor con un microtomo criostático (Thermo Fischer Scientific MICROM HM 550, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) y se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis.

Inmunohistoquímica

Atendiendo a las características propias de la lámina ungueal, se desarrolló un protocolo a partir del procedimiento estándar descrito previamente en (Rodríguez-Leon *et al.*, 2008). Una vez descongeladas, las criosecciones se fijaron (paraformaldehído 4% en PBS) durante 20min y se incubaron en tampón II durante 30min. Después de eliminar la gelatina de las criosecciones incubando a 60°C en TBS durante 10min y de lavar con TBS (3 lavados de 5min), se procedió a incubar con Triton-X-100 0.1% en TBS durante 1h. Tras otra hora de incubación con tampón de bloqueo (NGS 3%, Triton-X-100 0.5% en TBS), se procedió a la incubación por separado con cada uno de los anticuerpos (AE13 y CTK17) diluidos (1:100) en tampón de bloqueo dentro de una cámara humidificada, durante 12-16h y a 4°C. Tras lavar nuevamente con TBS (3 lavados de 5min), se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario diluido (1:200) en tampón de bloqueo dentro de una cámara humidificada, en oscuridad, durante 12-16h y a 4°C. Al día siguiente, tras lavar con TBS (3 lavados de 5min), tratar con DAPI (4',6 diamidino 2 fenilindol) diluido (1:10000) en TBS durante 10min, y lavar nuevamente con TBS (3 lavados de 5min), se procedió al montaje de las secciones con Mowiol.

Adquisición, procesamiento y cuantificación de imágenes

a) Inmunoblot

Una vez que se expusieron y revelaron las películas de rayos X, se escanearon y se procedió a la cuantificación de la intensidad de señal mediante el software de análisis de imagen de ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) para la cuantificación de señal en geles. Los resultados de los inmunoblots fueron obtenidos a partir de 3 repeticiones experimentales independientes.

b) Inmunohistoquímica

Para cada muestra de lámina ungueal, un total de diez secciones diferentes fueron observadas con un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse 80i, Tokio, Japón) y fotografiadas con una cámara digital de definición ultra alta (Nikon DXM1200F, Tokio, Japón) en las mismas condiciones (aumento: 40x, tiempo de exposición: 0.001s), al objeto de poder comparar la señal de las distintas imágenes obtenidas.

El análisis de las imágenes se realizó con el software libre y gratuito ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), cuantificando la intensidad del marcaje de cada anticuerpo (media del nivel de valor de gris) y la densidad de núcleos (número de núcleos: media de la superficie de la lámina). En el proceso de cuantificación de la intensidad del marcaje, se descartó sistemáticamente la señal procedente de los bordes del tejido y/o de posibles células epiteliales adheridas, al considerarse marcaje inespecífico.

SEM

La observación de la ultraestructura ungueal se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (Microscopio: Quanta 3D FEG, FEI, Eindhoven, Países Bajos. Detector: BSED, FEI, Eindhoven, Países Bajos) en condiciones de bajo vacío, según lo descrito previamente (Mingorance Álvarez *et al.*, 2021).

Tratamiento estadístico y variables de estudio

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el software estadístico SPSS para Windows, versión 22.0 (IBM, Armonk, NY, Estados Unidos). Todos los análisis de normalidad se realizaron mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk y el nivel de significación fue de 0.05 en todos los análisis realizados.

a) Inmunoblot

Se realizaron tanto pruebas T-student para muestras apareadas, como pruebas T-student para muestras independientes. Para las dos condiciones de extracción testadas (50mM y 200mM de 2-mercaptoetanol), las variables analizadas fueron: concentración media de proteína extraída, cuantificación media del nivel de expresión con el anticuerpo AE13 y cuantificación media del nivel de expresión con el anticuerpo CTK17.

Para comparar las concentraciones de proteína extraída y las cuantificaciones medias del nivel de expresión con cada anticuerpo, se analizaron las diferencias obtenidas en cada una de las condiciones de extracción testadas.

b) Inmunohistoquímica

En total, cinco variables fueron analizadas: edad, género, consistencia ungueal, intensidad del marcaje con cada uno de los dos anticuerpos testados (CTK17 y AE13) y densidad de núcleos. Se empleó la prueba de U de Mann Whitney para analizar la relación entre la consistencia ungueal y el sexo, frente al resto de variables cuantitativas. También se calculó el coeficiente de correlación de Spearman para analizar la relación entre las variables cuantitativas consideradas.

RESULTADOS

Tanto en los análisis de extracción proteica como en los de comparación de intensidad de marcaje, todas las variables analizadas siguieron la distribución normal (p -valores ≥ 0.148), lo que permitió la utilización de pruebas paramétricas.

En el caso de los datos inmunohistoquímicos, los resultados obtenidos del análisis de normalidad de las variables cuantitativas analizadas en función del sexo y de la consistencia ($n=16$) mostraron que, 7 de las variables no siguieron la distribución normal para el test Kolmogorov–Smirnov (p -valores ≤ 0.037) y 10 de las variables no siguieron la distribución normal para el test de Shapiro–Wilk (p -valores ≤ 0.032). Por esa razón, el resto del análisis estadístico se realizó mediante pruebas no paramétricas.

Extracción proteica en condiciones reductoras

Las 3 repeticiones independientes de las extracciones de proteínas realizadas a 50mM mostraron mayor mediana (3.07, 3.81 y 4.01) y rango (4.03, 3.95 y 4.40) que las extracciones realizadas a 200mM (2.49, 2.56 y 2.54) y (2.09, 2.39 y 2.17), respectivamente (Figura 12A).

La comparación entre la concentración media de proteína extraída a 50mM y a 200mM fue independiente del sexo y de la consistencia (p -valores ≥ 0.641). A 50mM, la concentración media de proteína extraída fue significativamente mayor ($3.80\mu\text{g}/\mu\text{l}$) que la obtenida a 200mM ($2.57\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (p -valor < 0.001) (Figura 12B). Además, para cada una de las dos concentraciones analizadas, no se observaron diferencias ni en función del sexo (p -valores ≥ 0.167) ni de la consistencia ungueal (p -valores ≥ 0.409) (Figura 12C).

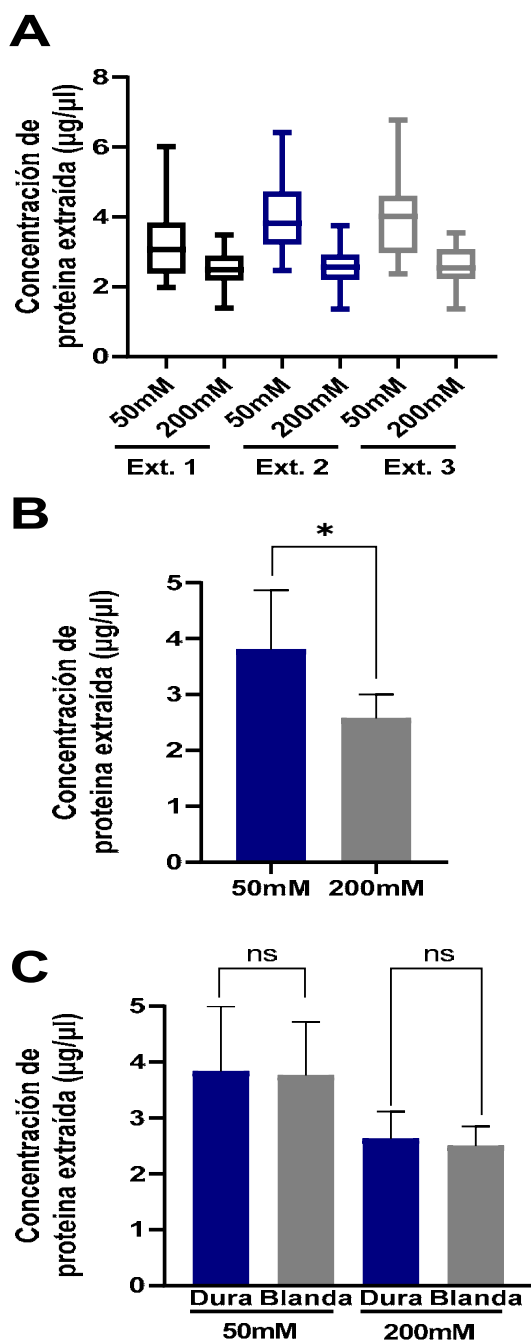


Figura 12. Principales resultados obtenidos de los experimentos de extracción proteica. A: diagrama de caja de las 3 repeticiones independientes del procedimiento de extracción. B: diagrama de barras comparando la concentración media de proteína extraída en las dos condiciones de extracción testadas (50mM y 200mM). C: diagrama de barras comparando la concentración media de proteína extraída en las dos condiciones de extracción testadas atendiendo a la consistencia ungueal (dura y blanda). 50mM: concentración de 2-mercaptoetanol en el tampón de extracción, 200mM: concentración de 2-mercaptoetanol en el tampón de extracción, Ext. 1: extracción independiente número 1, Ext. 2: extracción independiente número 2, Ext. 3: extracción independiente número 3, *: diferencias significativas ($P < 0.05$), ns: no significativo, Dura: uñas de consistencia dura, Blanda: uñas de consistencia blanda.

Nivel de expresión de proteínas extraídas en condiciones reductoras

La comparación de la cuantificación media del nivel de expresión con el anticuerpo AE13, entre las dos concentraciones consideradas (50mM-200mM), también se mostró independiente del sexo y de la consistencia ungueal (p-valores \geq 0.942) (Tabla 11).

Tabla 11. Relación entre la diferencia de la cuantificación media del nivel de expresión con cada anticuerpo con el sexo y la consistencia ungueal.

VARIABLE	T-student (p-valor)		
	Anticuerpo	Sexo	Consistencia ungueal
Diferencia cuantificación media del nivel de expresión	AE13	0.942	0.942
Diferencia cuantificación media del nivel de expresión	CTK17	0.341	0.001*

*: diferencia significativa.

Al analizar los resultados de la cuantificación media del nivel de expresión de los extractos obtenidos a 50mM y a 200mM, no se mostró evidencia suficiente como para rechazar que fueran iguales (p-valor=0.516). Para cada concentración analizada, tampoco se observaron diferencias significativas en función del sexo (p-valores \geq 0.802) ni de la consistencia ungueal (p-valores \geq 0.437) (Tabla 12), (Figura 13).

Tabla 12. Relación entre la cuantificación media del nivel de expresión con cada condición de extracción y anticuerpo con el sexo y la consistencia ungueal.

VARIABLE	T-student (p-valor)		
	Anticuerpo	Sexo	Consistencia ungueal
Cuantificación media del nivel de expresión a 50mM	AE13	0.886	0.437
Cuantificación media del nivel de expresión a 200mM	AE13	0.802	0.492
Cuantificación media del nivel de expresión a 50mM	CTK17	0.187	0.007*
Cuantificación media del nivel de expresión a 200mM	CTK17	0.880	<0.001*

*: diferencia significativa.

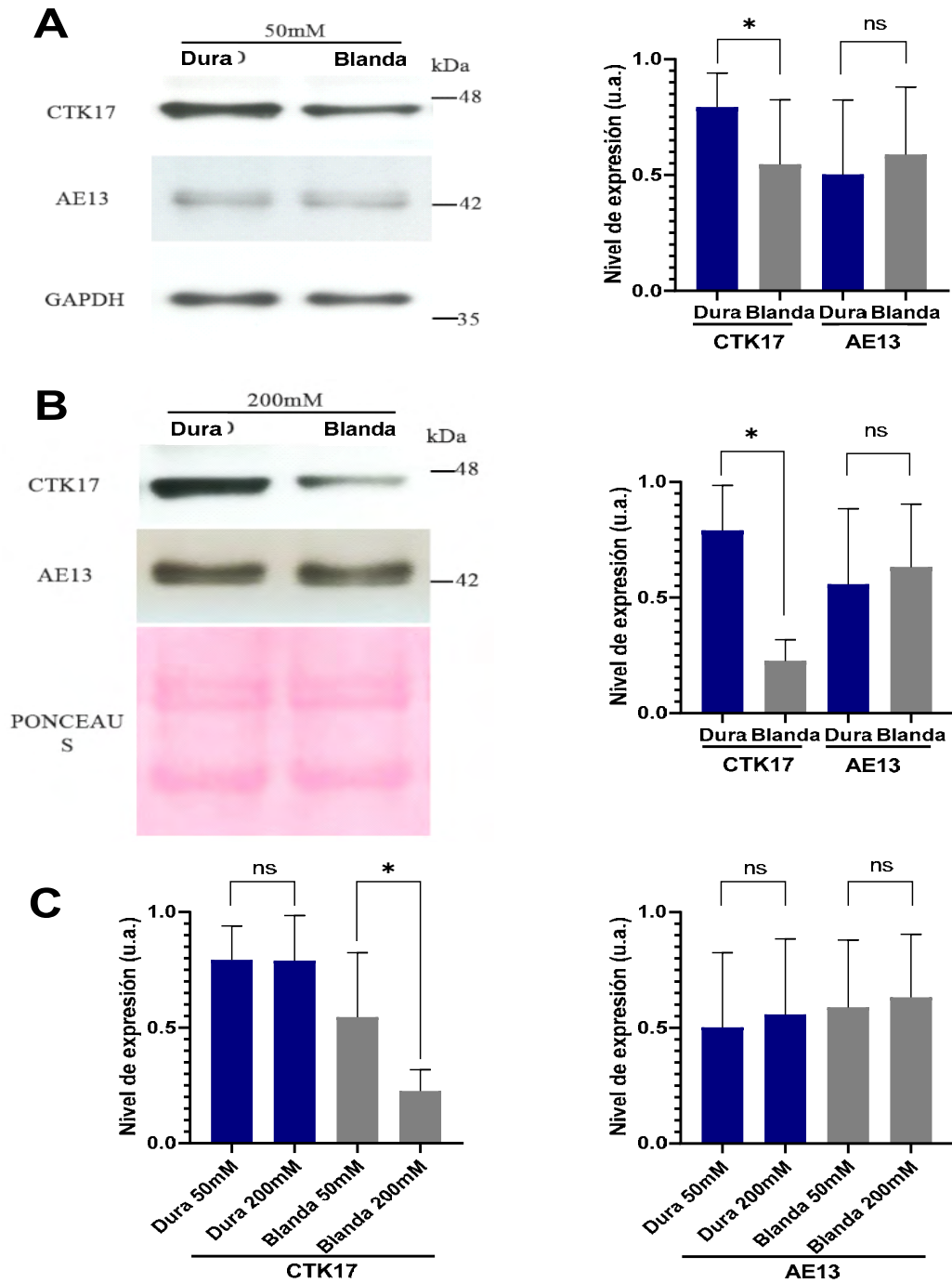


Figura 13. Nivel de expresión detectado con los anticuerpos AE13 y CTK17 en las dos condiciones de extracción testadas (50mM y 200mM). A: extractos obtenidos a 50mM. B: extractos obtenidos a 200mM. C: comparación del nivel de expresión entre consistencias ungueales (Dura y Blanda). A izquierda: inmunoblot a 50mM comparando las uñas de consistencia Dura y Blanda. A derecha: diagrama de barras comparando el nivel de expresión obtenido a 50mM con los dos anticuerpos testados en función de la consistencia ungueal. B izquierda: inmunoblot a 200mM comparando las uñas de consistencia dura y blanda. B derecha: diagrama de barras comparando el nivel de expresión obtenido a 200mM con los dos anticuerpos testados en función de la consistencia ungueal. C izquierda: diagrama de barras comparando el nivel de expresión

obtenido con el anticuerpo CTK17 en función de las dos condiciones de extracción y las dos consistencias ungueales testadas. C derecha: diagrama de barras comparando el nivel de expresión obtenido con el anticuerpo AE13 en función de las dos condiciones de extracción y las dos consistencias ungueales testadas. 50mM: concentración de 2-mercaptoetanol en el tampón de extracción, 200mM: concentración de 2-mercaptoetanol en el tampón de extracción, Dura: uñas de consistencia dura, Blanda: uñas de consistencia blanda, kDa: kilodaltons, u.a.: unidades arbitrarias, *: diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), ns: no significativo, GAPDH: control de carga a 50mM, Ponceau S: control de carga a 200mM.

Para el anticuerpo CTK17, la comparación entre la cuantificación media del nivel de expresión a 50mM y a 200mM no varió en función del sexo (p -valor=0.341), pero sí de la consistencia ungueal (p -valor=0.001) (Tabla 11). Concretamente, los datos observados al comparar la cuantificación media del nivel de expresión de los extractos obtenidos a 50mM y a 200mM en uñas de consistencia dura no mostraron evidencia suficiente como para rechazar que fueran iguales (p -valor=0.958). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas al comparar la cuantificación media del nivel de expresión en los extractos obtenidos a 50mM y a 200mM en uñas de consistencia blanda (p -valor=0.001). Para cada concentración no se observaron diferencias con respecto al sexo (p -valores \geq 0.187), pero sí en función de la consistencia ungueal (p -valores \leq 0.007) (Tabla 12 y figura 13).

En resumen, la cuantificación del nivel de expresión obtenido con el anticuerpo AE13 no varió ni en función del sexo ni de la consistencia ungueal (p -valores \geq 0.942). Sin embargo, los resultados obtenidos con el anticuerpo CTK17, mostraron diferencias significativas entre las uñas de consistencia blanda y las uñas de consistencia dura en cada una de las dos condiciones de extracción testadas (a 50mM y a 200mM) (p -valores \leq 0.007), y entre las uñas de consistencia blanda cuyos extractos fueron obtenidos a 50mM y 200mM (p -valor=0.001).

Procesamiento del tejido ungueal e histología

El tratamiento histológico previo de las muestras con el agente reductor 2-mercaptoetanol facilitó el seccionado, reduciendo la frecuencia en la que se producía la separación de la muestra del medio de inclusión, especialmente en las uñas de consistencia dura, en las que la probabilidad de que la muestra saltara y se separa

bruscamente del medio de inclusión en el momento en el que la cuchilla incidía sobre la muestra era bastante elevada.

De otra parte, el análisis ultraestructural mostró la presencia de tres capas: dorsal, intermedia y ventral de lámina ungueal (Figura 14A). Sin embargo, no siempre fue posible establecer claramente los límites entre ellas, como se puede comprobar en la Figura 14B, en la que el límite inferior de la capa intermedia es difícilmente apreciable con exactitud.

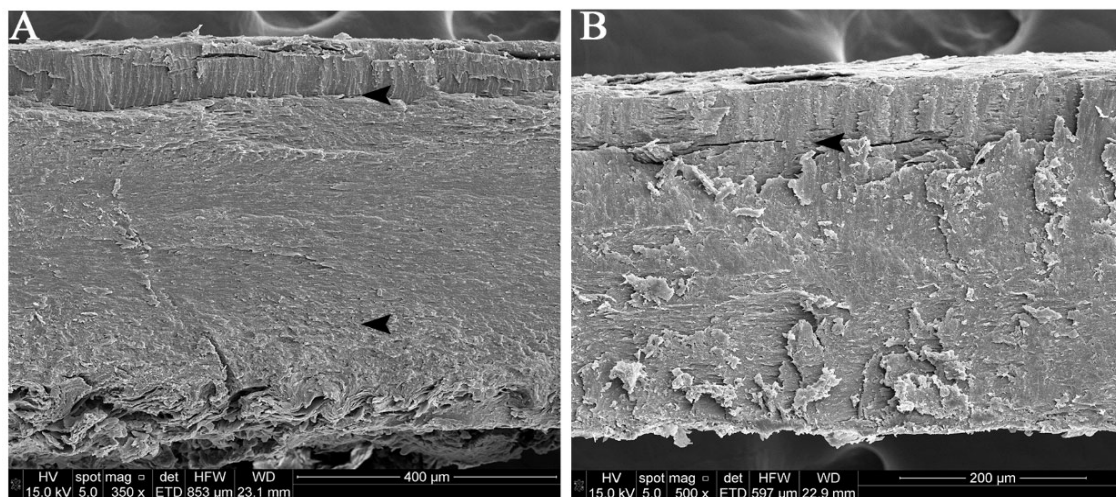


Figura 14. Ultraestructura y límites entre capas de láminas ungueales de consistencia blanda. Imágenes obtenidas mediante SEM en condiciones de alto vacío. A: lámina ungueal en la que se aprecian visualmente los límites inferiores de las capas dorsal e intermedia (cabezas de flecha), (350x). B: lámina ungueal en la que se aprecia visualmente el límite inferior de la capa dorsal (cabeza de flecha), pero no el límite inferior de la capa intermedia (500x).

Inmunohistoquímica

La tinción con tricrómico de Mallory reveló la presencia de escasas fibras de colágeno teñidas de azul (Figura 15A). La localización y la cantidad de núcleos fue variable (Figura 15A, B y C). En algunas secciones los núcleos se concentraron mayoritariamente en la capa intermedia (Figura 15C) y, en otras se distribuyeron de forma homogénea (Figura 15B). La cantidad de núcleos fue escasa en algunas secciones (Figura 15B) mientras que, en otras se observó mayor cantidad (Figura 15C), pero en todos los casos se trató de núcleos picnóticos con escasa actividad (Figura 15A, B y C).

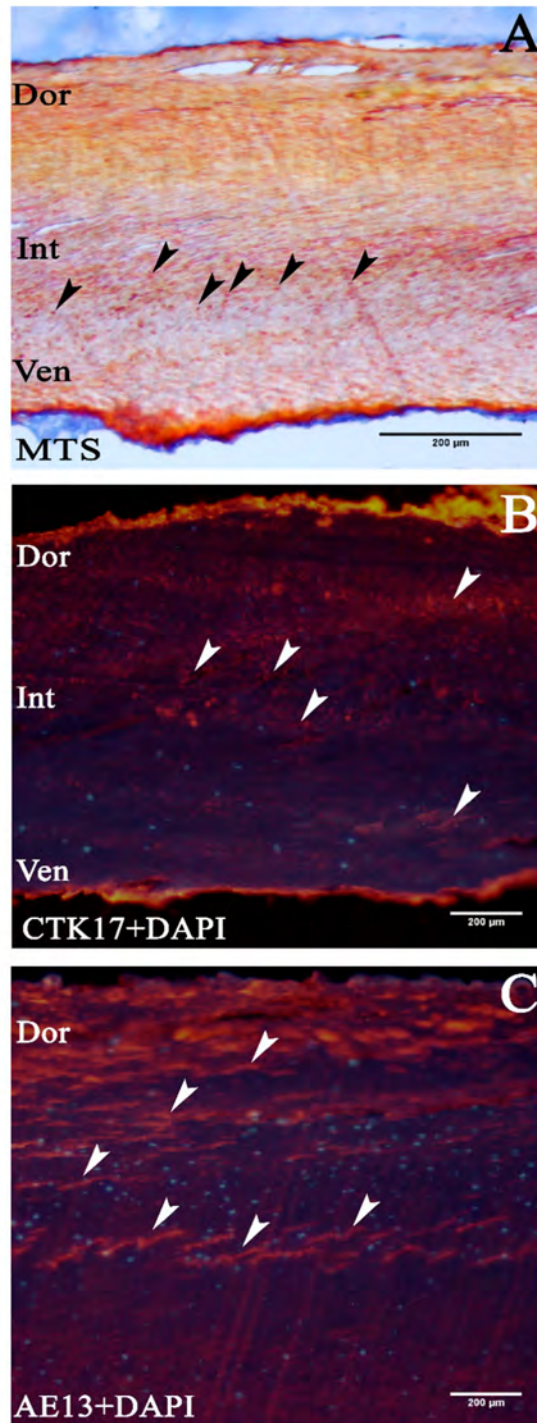


Figura 15. Ultraestructura a microscopía óptica y marcaje de láminas ungueales de adultos. A: ultraestructura de una sección de lámina ungueal de consistencia blanda de una mujer a microscopía óptica (400x), teñida con tricrómico de Mallory. Núcleos teñidos en color rojo (cabezas de flecha). B: microscopía de epifluorescencia (100x) de una sección de lámina ungueal de consistencia blanda de una mujer teñida con CTK17 y DAPI. Zonas de mayor intensidad de marcaje (cabezas de flechas). Núcleos teñidos en azul con DAPI. C: microscopía de epifluorescencia (100x) de una sección de lámina ungueal de consistencia blanda de un hombre teñida con AE13 y DAPI. Zonas de mayor intensidad de marcaje (cabezas de flechas). Núcleos teñidos en azul con DAPI. CTK17: citoqueratina 17, DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol, Dor: capa dorsal, Int: capa intermedia, MTS: tinción tricrómico de Mallory, Ven: capa ventral.

El protocolo inmunohistoquímico desarrollado permitió observar cierto marcaje en este tejido, especialmente en aquellas zonas donde las células no estaban fuertemente unidas entre sí y los antígenos quedaron más expuestos (Figura 15B y C). En la fFigura 16 también se aprecia una mayor intensidad de marcaje en las zonas del tejido donde las células no estaban fuertemente unidas entre sí (Figura 16A, B, C y D).

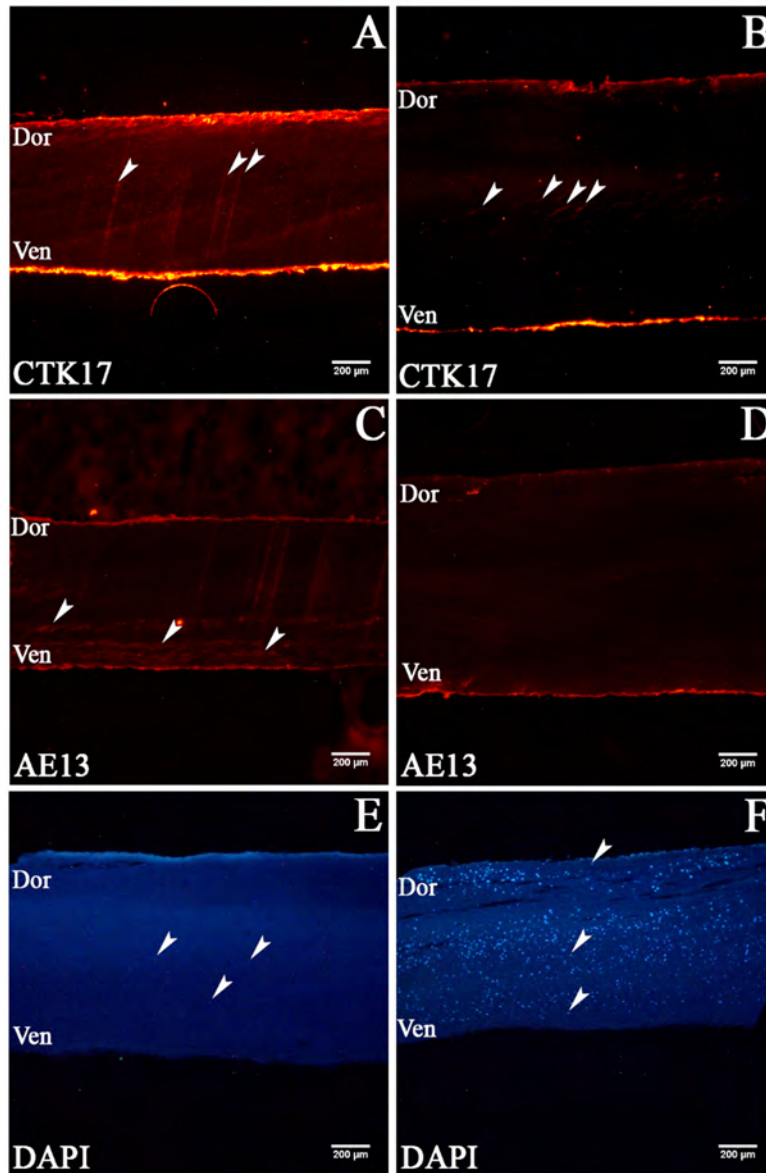


Figura 16. Secciones de láminas ungueales teñidas con CTK17 (A-B), AE13 (C-D) y DAPI (E-F) a microscopía de epifluorescencia (40x). (A) Lámina ungueal de consistencia dura de un hombre. (B) Lámina ungueal de consistencia blanda de un hombre. (C) Lámina ungueal de consistencia dura de un hombre. (D) Lámina ungueal de consistencia blanda de un hombre. Zonas de mayor intensidad de marcaje (cabezas de flechas) (A-C). (E) Lámina ungueal de consistencia blanda de una mujer con núcleos teñidos de azul con DAPI (cabezas de flechas). (F) Lámina ungueal de consistencia blanda de un hombre con núcleos teñidos de azul con DAPI (cabezas de flechas). CTK17: citoqueratina 17, DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol, Dor: capa dorsal, Ven: capa ventral.

Se detectó mayor cantidad de queratina 17 epitelial en las uñas de consistencia dura (Figura 16A) que en las uñas de consistencia blanda (Figura 16B). No se detectó expresión diferencial en las queratinas de pelo detectadas con el anticuerpo AE13 en función de la consistencia ungueal (Figura 16C y D). En ambos casos, se detectó señal inespecífica en los bordes del tejido, especialmente intensa en la superficie subungueal con el anticuerpo CTK17, consecuencia probablemente de células epiteliales todavía adheridas (Figura 16A, B, C y D). Toda la señal inespecífica detectada se descartó durante el análisis de las imágenes.

En algunas muestras se observó gran cantidad de núcleos distribuidos de forma homogénea en todo el tejido (Figura 16F) mientras que, en otras casi no se apreciaron (Figura 16E), aunque estas diferencias no se relacionaron con ninguna de las otras variables analizadas (Tabla 13).

Tabla 13. Resultados del análisis estadístico inferencial de las distintas variables analizadas.

Prueba U de Mann Whitney (p-valores)				
	Edad	CTK17	AE13	Núcleos/ μm^2
Consistencia ungueal	0.879	0.026*	0.970	0.621
Sexo	0.053	0.895	0.175	0.880
Coefficiente de correlación de Spearman (p-valores)				
	Edad	CTK17	AE13	Núcleo/ μm^2
Edad	-	0.383	0.742	0.353
CTK17	0.383	-	0.884	0.128
AE13	0.742	0.884	-	0.272
Núcleo/μm^2	0.353	0.128	0.272	-

*: diferencia significativa.

De todas las variables analizadas atendiendo a la consistencia ungueal, únicamente la intensidad del marcaje con el anticuerpo CTK17 mostró diferencias significativas (p-valor=0.026). En concreto, las uñas de consistencia dura mostraron intensidades de marcaje superiores que las uñas de consistencia blanda. Por tanto, ni la edad, ni la intensidad del marcaje con el anticuerpo AE13, ni la densidad de núcleos mostraron diferencias significativas en función de la consistencia ungueal (p-valores \geq 0.621) (Tabla 13).

Finalmente, ninguna de las variables analizadas mostró diferencias en función del sexo (p -valores >0.053), como tampoco se estableció correlación alguna entre las variables cuantitativas analizadas (p -valores >0.128) (Tabla 13).

DISCUSIÓN

El análisis ultraestructural de las láminas ungueales demostró la presencia de tres capas, tal y como se ha descrito previamente (Runne y Orfanos, 1981; Farren *et al.*, 2004). Sin embargo, la dificultad para establecer con claridad todos los límites visuales entre capas mediante una técnica tan específica para el estudio morfológico de superficie como es la SEM, puso de manifiesto la imposibilidad de realizar estudios comparativos de la expresión de queratinas entre capas concretas mediante otras técnicas con menor capacidad de análisis morfológico, como es el caso del análisis inmunohistoquímico, en el que el establecimiento de límites visuales entre capas no fue del todo posible.

Tanto los resultados obtenidos mediante inmunoblot como en los obtenidos en los análisis inmunohistoquímicos presentados en este capítulo, ponen de manifiesto la presencia de queratinas epiteliales y queratinas de pelo en las láminas ungueales. Estos resultados vienen a respaldar lo ya publicado sobre queratinas y lámina ungueal. En concreto, se sabe que el aproximadamente el 90% de las proteínas totales son queratinas o proteínas asociadas a ellas (Rice *et al.*, 2010) y que, dentro de este 90%, entre el 80-90% son queratinas de pelo (Lynch *et al.*, 1986; Heid *et al.*, 1988). Si bien en estos trabajos previos no se ha analizado la posible relación entre la presencia de determinadas queratinas en la lámina ungueal y la consistencia que presentan.

Contrariamente, las extracciones de proteínas realizadas en ambientes menos reductores (50mM) mostraron mayor concentración de proteína total que las extracciones realizadas a mayor concentración de agente reductor (200mM), en las que se favorece la solubilización de las queratinas de pelo más resistentes y mayoritarias. Por tanto, en condiciones de extracción más suaves, además de ser solubles las queratinas epiteliales (Kitahara y Ogawa, 1991), también deben solubilizar otro tipo de proteínas (de membrana o citoplasmáticas), incrementando el rendimiento de la extracción hasta superar el obtenido en condiciones más reductoras (Rice *et al.*, 2010).

Este es el caso, por ejemplo, de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa que interviene en la glucólisis y que únicamente se ha detectado en extractos realizados a 50mM, por lo que ha sido empleada como control de carga en esos inmunoblots.

Además, los resultados obtenidos en las 3 repeticiones independientes de las extracciones de proteínas realizadas muestran mayor variabilidad en aquellas realizadas a 50mM que en las realizadas a 200mM. Estos resultados respaldan la hipótesis de que una mayor diversidad de proteínas es extraída en ambientes menos reductores mientras que, en ambientes más reductores, el tipo de proteínas solubilizadas es más homogéneo y la variabilidad es menor. Sin embargo, la lámina ungueal no se caracteriza por ser un tejido muy activo desde un punto de vista metabólico, ya que está constituida por escasas células con núcleos picnóticos y células enucleadas en las que el núcleo degenerado ha desaparecido del citoplasma (Runne y Orfanos, 1981). Probablemente, junto con las proteínas minoritarias que no son queratinas presentes en la lámina ungueal, algunas queratinas de pelo también puedan ser extraídas en ambientes menos reductores (Rice *et al.*, 2010), a pesar de ser casi insolubles en estas condiciones (Kitahara y Ogawa, 1991).

Mención especial requiere el trabajo con anejos cutáneos altamente queratinizados, como es el caso de las láminas ungueales de adultos, supone una dificultad añadida al manejo experimental de estos tejidos. Especialmente durante el proceso de corte de la muestra con microtomo criostático (Heid *et al.*, 1988) y marcaje, obteniendo en la mayoría de los casos ligeros marcajes (Baden y Kubitius, 1984; Moll, I. *et al.*, 1988; McGowan y Coulombe, 2000; Fleckman *et al.*, 2013) en comparación con el marcaje obtenido en los tejidos blandos circundantes, lo que dificulta la interpretación de los resultados en la lámina ungueal. Además, la cantidad de resultados disponibles en trabajos inmunohistoquímicos realizados sobre los tejidos blandos del aparato ungueal es sensiblemente superior y más completa que la obtenida sobre la lámina ungueal (Baden y Kubitius, 1984; Heid *et al.*, 1988; Moll, I. *et al.*, 1988; Westgate *et al.*, 1997; Waseem *et al.*, 1999; de Berker *et al.*, 2000; McGowan y Coulombe, 2000; Perrin *et al.*, 2004; Perrin, 2007; Perrin *et al.*, 2011) reflejo probablemente, del difícil manejo de este tejido. Algunos de estos trabajos se realizaron sobre aparatos ungueales procedentes de niños y fetos (Heid *et al.*, 1988; Moll, I. *et al.*, 1988; Westgate *et al.*,

1997; Waseem *et al.*, 1999), asumiendo la premisa de que, en principio, las uñas adultas tendrían resultados similares (Heid *et al.*, 1988), lo que resulta arriesgado teniendo en cuenta que la expresión de queratinas en la epidermis de adultos difiere mucho de la piel fetal (Waseem *et al.*, 1999).

Consideramos que el tratamiento previo de las muestras con un agente reductor como es el 2-mercaptoetanol antes del corte, facilitó la obtención de secciones histológicas atendiendo a la experiencia adquirida con dos muestras de distinta consistencia ungueal. Con respecto a la intensidad de la señal, es importante recordar que las condiciones de exposición en este trabajo no fueron las óptimas para cada corte histológico en particular, sino que se establecieron unas condiciones fijas y homogéneas para todas las muestras, que permitieran establecer relaciones posteriores de comparación entre ellas. Esto diferencia el presente trabajo del resto de trabajos disponibles, en los que no se realizaron análisis comparativos de intensidades de señal en función de la consistencia ungueal (Baden y Kubilus, 1984; Heid *et al.*, 1988; Moll, I. *et al.*, 1988; Westgate *et al.*, 1997; Waseem *et al.*, 1999; McGowan y Coulombe, 2000).

El anticuerpo AE13 no resultó ser útil para diferenciar las uñas atendiendo a su consistencia, pues su nivel de expresión no varió ni atendiendo a la consistencia ungueal ni a las condiciones más o menos reductoras de la extracción, ni a ninguna de las otras variables analizadas. Tampoco los análisis inmuistoquímicos realizados con este anticuerpo permitieron establecer diferencias estadísticamente significativas entre las uñas de consistencia dura y las de consistencia blanda.

Sin embargo, los resultados obtenidos tanto con los inmunoblots como con las técnicas inmunohistoquímicas demuestran que las uñas de consistencia dura expresan más K17 que las uñas de consistencia blanda. La K17 es una queratina epitelial de tipo I que se ha detectado en la matriz ungueal asociada a las células precursoras, en el lecho ungueal (McGowan y Coulombe, 2000) y en la lámina ungueal (Heid *et al.*, 1988). Además, se la ha relacionado con epitelios sometidos a estrés físico y que, por tanto, tienen altas tasas de renovación celular (Swensson *et al.*, 1998). Como consecuencia de las actividades de la vida cotidiana: caminar, correr, etc. las uñas están continuamente sometidas a fuerzas e impactos que inducen su flexión (Forslind *et al.*, 1980). Parece lógico pensar que las uñas de consistencia dura se adapten peor a estas fuerzas y sean

más sensibles a este tipo de estrés que las láminas ungueales de consistencia blanda, probablemente más flexibles y adaptables. Estas láminas ungueales menos adaptables estarían sometidas a un estrés mayor, lo que podría inducir un incremento en la síntesis de K17 y, por tanto, una mayor presencia de esta queratina en las láminas ungueales de uñas de consistencia dura. Además, esta diferencia de expresión en función de la consistencia ungueal es independiente de las condiciones de extracción, aunque en uñas de consistencia blanda, el nivel de expresión es mayor en condiciones de extracción menos reductoras, lo que respalda lo ya descrito en cuanto a solubilidad de queratinas y poder reductor (Kitahara y Ogawa, 1991).

La consistencia ungueal varía en función de la edad, del sexo y de la actividad deportiva. Así, los hombres en edad adulta y los jóvenes que practican deporte presentan uñas de consistencia dura, con mayor frecuencia. A diferencia de las mujeres adultas y de los jóvenes sedentarios, en los que la consistencia ungueal más frecuente es la media y la blanda (Pérez Pico *et al.*, 2017; Pérez Pico *et al.*, 2019). Atendiendo a estos resultados y de forma contraria a lo que cabría esperar se vio que, en el proceso de desarrollo de un modelo matemático predictivo de la consistencia ungueal, ni el sexo ni la edad demostraron ser variables con capacidad predictora de la consistencia ungueal (Mingorance Álvarez *et al.*, 2021). De forma análoga, los resultados aportados en el presente trabajo tampoco han permitido establecer ninguna relación entre la consistencia ungueal y el sexo, puesto que consideramos que la muestra elegida pertenece a la misma franja de edad. En consecuencia y a la vista de lo expuesto podemos afirmar que, aunque la frecuencia de cada consistencia ungueal varía en la población, las uñas de consistencia dura y blanda son iguales en hombres y en mujeres, es decir, no hay diferencias en la consistencia ungueal debidas al sexo.

Se ha aportado evidencia experimental de que las uñas de consistencia dura y las uñas de consistencia blanda presentan diferente contenido de K17, una queratina epitelial de tipo I, siendo mayor en las uñas de consistencia dura. El papel de la K17 en láminas ungueales sanas refuerza la hipótesis de que no todas las uñas tienen la misma consistencia ungueal y establece diferencias a nivel molecular.

Por todo lo expuesto, consideramos que se ha aportado evidencia experimental de que la K17, una queratina epitelial de tipo I, muestra un patrón de expresión

diferencial en función de la consistencia ungueal. Concretamente, las uñas de consistencia dura presentan mayor contenido de esta queratina que las uñas de consistencia blanda.

CONCLUSIONES

1. El establecimiento de los límites entre las capas que componen las láminas ungueales requiere de técnicas específicas para el análisis morfológico y, aun así, no aseguran la correcta delimitación de éstas. Por tanto, cualquier otra técnica menos específica para el análisis morfológico de la lámina ungueal incluido el estudio inmunohistoquímico, no es viable para un análisis comparado entre capas.
2. La consistencia ungueal no afecta al rendimiento de la extracción proteica, bajo idénticas condiciones reductoras. Sin embargo, en condiciones menos reductoras es posible extraer una mayor diversidad de proteínas que en condiciones más reductoras, lo que incrementa el rendimiento de la extracción.
3. Se ha podido establecer una relación entre el nivel de expresión de la queratina epitelial K17 y las láminas ungueales de consistencia dura, bajo las dos condiciones reductoras analizadas. Así pues, la K17 permite identificar las uñas de consistencia dura mediante inmunoblot.
4. Se ha podido establecer una relación entre el nivel de expresión de la queratina epitelial K17 y las láminas ungueales de consistencia dura. Así pues, la K17 permite identificar las uñas de consistencia dura directamente sobre el tejido mediante técnicas inmunohistoquímicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Baden, H. P. y Kubilus, J. (1984). A comparative study of the immunologic properties of hoof and nail fibrous proteins. *J Invest Dermatol*, 83(5), 327-331. doi:<http://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12264121>
- Bowden, P. E., Quinlan, R. A., Breitzkreutz, D. y Fusenig, N. E. (1984). Proteolytic modification of acidic and basic keratins during terminal differentiation of mouse and human epidermis. *Eur J Biochem*, 142(1), 29-36. doi:<http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08246.x>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254. doi:[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- de Berker, D., Wojnarowska, F., Sviland, L., Westgate, G. E., Dawber, R. P. y Leigh, I. M. (2000). Keratin expression in the normal nail unit: markers of regional differentiation. *Br J Dermatol*, 142(1), 89-96. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2000.03246.x>
- Eichner, R., Sun, T. T. y Aebi, U. (1986). The role of keratin subfamilies and keratin pairs in the formation of human epidermal intermediate filaments. *J Cell Biol*, 102(5), 1767-1777. doi:<http://doi.org/10.1083/jcb.102.5.1767>
- Farren, L., Shayler, S. y Ennos, A. R. (2004). The fracture properties and mechanical design of human fingernails. *J Exp Biol*, 207(Pt 5), 735-741. doi:<https://doi.org/10.1242/jeb.00814>
- Fleckman, P., Jaeger, K., Silva, K. A. y Sundberg, J. P. (2013). Comparative anatomy of mouse and human nail units. *Anat Rec (Hoboken)*, 296(3), 521-532. doi:<https://doi.org/10.1002/ar.22660>
- Forslind, B., Nordstrom, G., Toijer, D. y Eriksson, K. (1980). The rigidity of human fingernails: a biophysical investigation on influencing physical parameters. *Acta Derm Venereol*, 60(3), 217-222. doi:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6158223/>
- Fraser, R. D., Macrae, T. P. y Rogers, G. E. (1959). Structure of alpha-keratin. *Nature*, 183(4661), 592-594. doi:<https://doi.org/10.1038/183592a0>
- Fraser, R. D. y Parry, D. A. (2009). The role of beta-sheets in the structure and assembly of keratins. *Biophys Rev*, 1(1), 27. doi:<http://doi.org/10.1007/s12551-008-0005-0>
- Gillespie, J. M. y Lennox, F. G. (1955). Keratin derivatives extracted from wool with alkaline thioglycollate solutions. *Australian Journal of Biological Sciences*, 8, 97-113. doi:<https://doi.org/10.1071/B19550097>
- Hatzfeld, M. y Weber, K. (1990). The coiled coil of in vitro assembled keratin filaments is a heterodimer of type I and II keratins: use of site-specific mutagenesis and recombinant protein expression. *J Cell Biol*, 110(4), 1199-1210. doi:<http://doi.org/10.1083/jcb.110.4.1199>
- Heid, H. W., Moll, I. y Franke, W. W. (1988). Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. II. Concomitant and mutually exclusive synthesis of trichocytic and epithelial cytokeratins in diverse human and bovine tissues (hair follicle, nail bed and matrix, lingual papilla, thymic reticulum). *Differentiation*, 37(3), 215-230. doi:<http://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1988.tb00724.x>
- Kitahara, T. y Ogawa, H. (1991). The extraction and characterization of human nail keratin. *J Dermatol Sci*, 2(6), 402-406. doi:[http://doi.org/10.1016/0923-1811\(91\)90003-g](http://doi.org/10.1016/0923-1811(91)90003-g)
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. doi:<https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Langbein, L., Rogers, M. A., Winter, H., Praetzel, S., Beckhaus, U., Rackwitz, H. R. y Schweizer, J. (1999). The catalog of human hair keratins. I. Expression of the nine type I members in the hair follicle. *J Biol Chem*, 274(28), 19874-19884. doi:<http://doi.org/10.1074/jbc.274.28.19874>

- Lee, C. H., Kim, M. S., Chung, B. M., Leahy, D. J. y Coulombe, P. A.** (2012). Structural basis for heteromeric assembly and perinuclear organization of keratin filaments. *Nat Struct Mol Biol*, 19(7), 707-715. doi:<http://doi.org/10.1038/nsmb.2330>
- Lynch, M. H., O'Guin, W. M., Hardy, C., Mak, L. y Sun, T. T.** (1986). Acidic and basic hair/nail ("hard") keratins: their colocalization in upper cortical and cuticle cells of the human hair follicle and their relationship to "soft" keratins. *J Cell Biol*, 103(6 Pt 2), 2593-2606. doi:<https://doi.org/10.1083/jcb.103.6.2593>
- Marshall, R. C.** (1983). Characterization of the proteins of human hair and nail by electrophoresis. *J Invest Dermatol*, 80(6), 519-524. doi:<http://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12535117>
- McGowan, K. M. y Coulombe, P. A.** (2000). Keratin 17 expression in the hard epithelial context of the hair and nail, and its relevance for the pachyonychia congenita phenotype. *J Invest Dermatol*, 114(6), 1101-1107. doi:<http://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00986.x>
- Miller, R. K., Khuon, S. y Goldman, R. D.** (1993). Dynamics of keratin assembly: exogenous type I keratin rapidly associates with type II keratin in vivo. *J Cell Biol*, 122(1), 123-135. doi:<http://doi.org/10.1083/jcb.122.1.123>
- Mingorance Álvarez, E., Martínez Quintana, R., Pérez Pico, A. M. y Mayordomo, R.** (2021). Predictive Model of Nail Consistency Using Scanning Electron Microscopy with Energy-Dispersive X-Ray. *Biology (Basel)*, 10(1). doi:<http://doi.org/10.3390/biology10010053>
- Moll, I., Heid, H. W., Franke, W. W. y Moll, R.** (1988). Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. III. Hair and nail formation during human fetal development. *Differentiation*, 39(3), 167-184. doi:<http://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1988.tb00092.x>
- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. y Krepler, R.** (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31(1), 11-24. doi:[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90400-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90400-7)
- Pérez Pico, A. M., Mingorance Álvarez, E., Caballé Cervigón, N. y Mayordomo Acevedo, R.** (2019). Importance of Preexisting Physical Factors in the Development of Dermatological and Muscular Lesions During Hiking. *Int J Low Extrem Wounds*, 18(2), 161-170. doi:<https://doi.org/10.1177/1534734619845600>
- Pérez Pico, A. M., Verjano, E. y Mayordomo, R.** (2017). Relation between nail consistency and incidence of ingrown toenails in young male runners. *J Am Podiatr Med Assoc*, 107(2), 137-143. doi:<https://doi.org/10.7547/15-121>
- Perrin, C.** (2007). Expression of follicular sheath keratins in the normal nail with special reference to the morphological analysis of the distal nail unit. *Am J Dermatopathol*, 29(6), 543-550. doi:<https://doi.org/10.1097/dad.0b013e318158d741>
- Perrin, C., Langbein, L. y Schweizer, J.** (2004). Expression of hair keratins in the adult nail unit: an immunohistochemical analysis of the onychogenesis in the proximal nail fold, matrix and nail bed. *Br J Dermatol*, 151(2), 362-371. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2004.06108.x>
- Perrin, C., Langbein, L., Schweizer, J., Cannata, G. E., Balaguer, T., Chignon-Sicart, B., Garzon, J. M., Benchetrit, M. y Michiels, J. F.** (2011). Onychomatricoma in the light of the microanatomy of the normal nail unit. *Am J Dermatopathol*, 33(2), 131-139. doi:<http://doi.org/10.1097/DAD.0b013e3181f8c39a>
- Rice, R. H., Xia, Y., Alvarado, R. J. y Phinney, B. S.** (2010). Proteomic analysis of human nail plate. *J Proteome Res*, 9(12), 6752-6758. doi:<https://doi.org/10.1021/pr1009349>
- Rodriguez-Leon, J., Rodriguez Esteban, C., Marti, M., Santiago-Josefat, B., Dubova, I., Rubiralta, X. y Izpisua Belmonte, J. C.** (2008). Pitx2 regulates gonad morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(32), 11242-11247. doi:<http://doi.org/10.1073/pnas.0804904105>

- Rogers, M. A., Langbein, L., Praetzel-Wunder, S., Winter, H. y Schweizer, J.** (2006). Human hair keratin-associated proteins (KAPs). *Int Rev Cytol*, 251, 209-263. doi:[https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(06\)51006-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)51006-X)
- Runne, U. y Orfanos, C. E.** (1981). The human nail. Structure, growth and pathological changes. *Curr. Probl. Derm.*, 9, 102-149. doi:<https://doi.org/10.1159/000403346>
- Sanghvi-Shah, R. y Weber, G. F.** (2017). Intermediate Filaments at the Junction of Mechanotransduction, Migration, and Development. *Front Cell Dev Biol*, 5, 81. doi:<http://doi.org/10.3389/fcell.2017.00081>
- Schweizer, J., Bowden, P. E., Coulombe, P. A., Langbein, L., Lane, E. B., Magin, T. M., Maltais, L., Omary, M. B., Parry, D. A. D., Rogers, M. A. y Wright, M. W.** (2006). New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol*, 174(2), 169-174. doi:<https://doi.org/10.1083/jcb.200603161>
- Steinert, P. M., Idler, W. W. y Zimmerman, S. B.** (1976). Self-assembly of bovine epidermal keratin filaments in vitro. *J Mol Biol*, 108(3), 547-567. doi:[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(76\)80136-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(76)80136-2)
- Steinert, P. M., Jones, J. C. y Goldman, R. D.** (1984). Intermediate filaments. *J Cell Biol*, 99(1 Pt 2), 22s-27s. doi:<http://doi.org/10.1083/jcb.99.1.22s>
- Swensson, O., Langbein, L., McMillan, J. R., Stevens, H. P., Leigh, I. M., McLean, W. H., Lane, E. B. y Eady, R. A.** (1998). Specialized keratin expression pattern in human ridged skin as an adaptation to high physical stress. *Br J Dermatol*, 139(5), 767-775. doi:<http://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1998.02499.x>
- Waseem, A., Dogan, B., Tidman, N., Alam, Y., Purkis, P., Jackson, S., Lalli, A., Machesney, M. y Leigh, I. M.** (1999). Keratin 15 expression in stratified epithelia: downregulation in activated keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 112(3), 362-369. doi:<http://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00535.x>
- Weigmann, H. D.** (1968). Reduction of disulfide bonds in keratin with 1,4-dithiothreitol. I. Kinetic investigation. *6*(8), 2237-2253. doi:<https://doi.org/10.1002/pol.1968.150060819>
- Westgate, G. E., Tidman, N., De Berker, D., Blount, M. A., Philpott, M. P. y Leigh, I. M.** (1997). Characterization of LHTric-1, a new monospecific monoclonal antibody to the trichocyte keratin Ha1. *Br J Dermatol*, 137(1), 24-30. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1997.1763184.x>
- Wiedemann, C., Kumar, A., Lang, A. y Ohlenschlager, O.** (2020). Cysteines and Disulfide Bonds as Structure-Forming Units: Insights From Different Domains of Life and the Potential for Characterization by NMR. *Front Chem*, 8, 280. doi:<https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00280>



Capítulo III

Desarrollo de un dispositivo medidor de la consistencia ungueal y análisis inicial de su funcionamiento con testigos inertes y participantes *in vivo*

INTRODUCCIÓN

El material queratinoso que compone la lámina ungueal se considera uno de los materiales más resistentes presentes en la naturaleza (Ashby *et al.*, 1995). Como se ha mencionado anteriormente, está compuesto por dos elementos: una red de FI embebida en una matriz proteica (Chou y Buehler, 2012). Los principales factores que determinan sus propiedades mecánicas son básicamente, las propiedades físicas y mecánicas de ambos elementos independientemente, la forma en la que se organizan e interactúan y la proporción volumétrica entre ambos elementos (Fraser y Macrae, 1980), si bien no se debe despreciar el efecto que puede producir en las propiedades mecánicas y físicas globales del material los elementos presentes individualmente (Zhao *et al.*, 2021). Para analizar el comportamiento mecánico del material queratinoso, es necesario someterlo a distintas fuerzas de tracción, compresión, flexión y torsión (Rodas Durán, 2003; Mysore *et al.*, 2021).

Propiedades mecánicas de los materiales

La tenacidad es la propiedad de los materiales definida por la energía necesaria para romper un material intacto, sin muescas. Por tanto, es esencialmente la energía mecánica equivalente a la resistencia a la fractura de ese material. Una medida tradicionalmente empleada de la tenacidad ha sido el trabajo de fractura, definido como el trabajo por unidad de superficie necesario para romper un material en dos piezas (Ritchie *et al.*, 2008).

La dureza es otra de las propiedades físicas de los materiales definida como la medida de la resistencia a la penetración sobre la superficie de un material efectuada por un objeto duro denominado indentador (Knoop *et al.*, 1939).

La flexibilidad y la rigidez son propiedades opuestas. La flexibilidad se define como la capacidad de un material de ser deformado sin sufrir deterioro estructural alguno, mientras que la rigidez es la propiedad de un material de oponerse a la deformación. No debe confundirse la flexibilidad con la elasticidad, que es la capacidad de un material de recuperar su forma inicial tras haber sufrido una deformación al eliminar la fuerza externa aplicada (Jachowicz y McMullen, 2002). El módulo de elasticidad o módulo de Young permite estudiar la elasticidad de los materiales en

función de la deformación y la tensión. La deformación (ϵ) es la variación relativa de la forma debida a la aplicación de una fuerza. Por ejemplo, para una barra sometida a fuerzas de tracción, la deformación viene definida por el cociente entre el incremento de la longitud (ΔL) y la longitud inicial (L):

$$\epsilon = \frac{\Delta L}{L}$$

La tensión (σ) es el cociente entre la fuerza ejercida (F) sobre el objeto y el área de sección transversal de éste (A) (Tipler y Mosca, 2010):

$$\sigma = \frac{F}{A}$$

La representación gráfica de la tensión en función de la deformación permite identificar el límite lineal (A) donde la tensión mantiene una relación lineal con la deformación, el límite elástico (B) en el que una vez eliminada la fuerza, el material recupera su forma original y el punto de rotura (C) localizado en la región inelástica del gráfico, donde el material se deforma permanentemente y, que marca la tensión a la que se produce la ruptura del material (Figura 17).

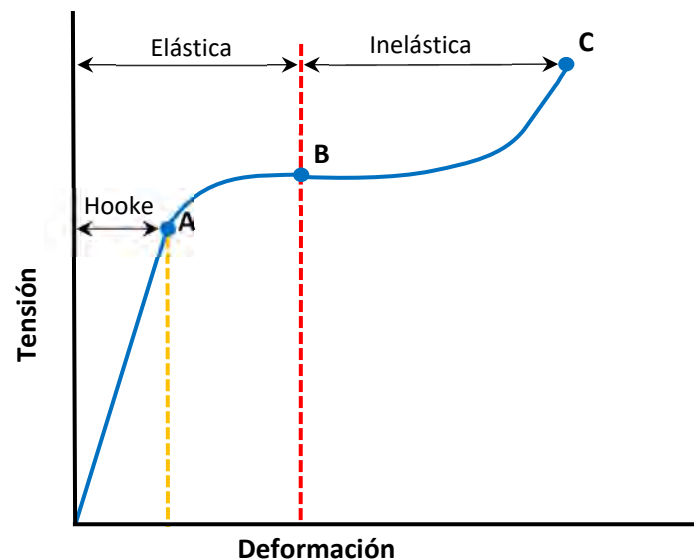


Figura 17. Representación gráfica de la tensión en función de la deformación de un material sólido. A: límite lineal, B: límite elástico, C: punto de rotura, línea discontinua amarilla: el gráfico es lineal hasta el punto A, la tensión es proporcional a la deformación, se cumple la ley de Hooke y el módulo de elasticidad es constante, línea discontinua roja: marca el límite en el que el material pasa de comportarse de forma elástica a inelástica. Adaptado de (Tipler y Mosca, 2010).

El módulo de Young (Y), se puede calcular en la parte lineal de los gráficos de tensión-deformación, donde se cumple la Ley de Hooke y la deformación cambia linealmente con la tensión. Se trata pues, de una constante, resultado del cociente entre la tensión y la deformación, cuyas unidades son N/m² (Rodas Durán, 2003; Tipler y Mosca, 2010).

$$Y = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

Condiciones ambientales y propiedades mecánicas de la lámina ungueal

La mayoría de las propiedades mecánicas de las láminas ungueales se ven afectadas por su grado de hidratación, el cual depende a su vez, de la humedad relativa (HR) y de la T^a del ambiente en el que se encuentran. De hecho, el contenido en agua de las láminas ungueales varía en función de la HR del ambiente describiendo una curva de tipo exponencial (Fraser y Macrae, 1980) aunque, *in vivo* normalmente se encuentra entre 14-30% (Farran *et al.*, 2008). Además, la capacidad de retención de agua en las láminas ungueales es similar a la observada en el pelo, pero ambas están muy por debajo de la del estrato córneo de la epidermis, especialmente a humedades relativas altas, probablemente debido al componente lipídico del estrato córneo epidérmico (Baden *et al.*, 1973).

El trabajo de fractura alcanza el valor máximo con humedades relativas del 55% y disminuye para humedades relativas superiores e inferiores. La dirección de la fractura también influye en el valor del trabajo de fractura, siendo mayor en dirección perpendicular al pliegue proximal (6 a 22 kJm⁻²) que en dirección lateral (3 a 11kJm⁻²) (Fraser y Macrae, 1980; Farren *et al.*, 2004) debido a las características propias de la histología de la lámina ungueal, puesto que el mayor grosor corresponde a la capa intermedia en la que los filamentos de queratina se disponen paralelamente al pliegue proximal (Farren *et al.*, 2004). La flexibilidad de las láminas ungueales también varía en función del grado de hidratación del tejido incrementándose significativamente tras una hora de inmersión en agua (Finlay *et al.*, 1980). Finalmente, se han descrito módulos de Young en las láminas ungueales de manos (3.5-5.5 dyn/cm²) y pies (5.0-9.5 dyn/cm²), si bien el valor de estas constantes no depende del grosor, longitud o curvatura de la

lámina ungueal, sí parece variar en función del grado de hidratación (Baden, 1970; Forslind *et al.*, 1980).

Modelo viscoelástico de orden fraccionario

En el extremo opuesto al modelo puramente elástico basado en la Ley de Hooke, se encuentra el modelo viscoelástico de orden fraccionario capaz de describir un comportamiento más complejo como es el viscoelástico con un pequeño número de parámetros (Bonfanti *et al.*, 2020) entre los que se encuentra el coeficiente alfa (Traver *et al.*, 2021).

Se ha considerado el modelo viscoelástico para explicar el comportamiento mecánico de las láminas ungueales (Fraser y Macrae, 1980; Perugini *et al.*, 2020) y dar respuesta a las diferentes observaciones realizadas. En primer lugar, la lámina ungueal recupera gran parte de su forma rápidamente tras eliminar la tensión, comportamiento compatible con el componente elástico del modelo, pero requiere más de 17h (Forslind *et al.*, 1980). En segundo lugar, experimentos para calcular la dureza de la lámina ungueal mediante indentadores colocados en la superficie dorsal causan deformaciones irrecuperables a corto plazo tras el contacto entre el indentador y la superficie de la lámina (Newman y Young, 1967), difícilmente explicables por un modelo puramente elástico. Para finalizar, a microscopía electrónica se observa que las capas intermedia y ventral muestran un comportamiento más plástico (Forslind y Thyresson, 1975), compatible con el componente viscoso del modelo viscoelástico propuesto.

Dispositivos de medida de las propiedades mecánicas de las láminas ungueales

A lo largo de la historia se han desarrollado y utilizado numerosos dispositivos para abordar el estudio de las propiedades físicas de la uña y su comportamiento mecánico, desde durómetros para medir su dureza (Knoop *et al.*, 1939; Newman y Young, 1967; Farran *et al.*, 2008) y micrómetros para medir su grosor (Young *et al.*, 1965; Langford *et al.*, 1989; Johnson y Shuster, 1994; de Berker *et al.*, 1996; Kobayachi *et al.*, 1999), hasta flexómetros para medir su flexibilidad (Finlay *et al.*, 1980), dispositivos de carga para medir su rigidez (Forslind *et al.*, 1980) y equipamientos de torsión para determinar el módulo de torsión (Farran *et al.*, 2009), pasando por dispositivos más complejos (Maloney y Paquette, 1977; Perugini *et al.*, 2020). A pesar de todo, ninguno de los

dispositivos de medida diseñados hasta la fecha se han desarrollado hasta el punto de resultar una herramienta de utilidad en el trabajo diario del podólogo y del profesional de la salud que requiera de una valoración más completa de la lámina ungueal *in vivo*.

OBJETIVOS

1. Desarrollar un dispositivo medidor de la consistencia ungueal (MCU) que permita determinar la consistencia de forma objetiva y cuantificable.
2. Determinar si el MCU permite detectar diferencias atendiendo a la consistencia ungueal en ensayos de repetición, tanto con testigos inertes como con participantes de referencia.
3. Determinar si el MCU permite detectar diferencias atendiendo a la consistencia ungueal en ensayos de medida única, realizados en dos muestras de edades diferentes.
4. Estudiar si las condiciones ambientales de temperatura y humedad relativa pueden influir en los datos obtenidos con el MCU.

MATERIAL Y MÉTODOS

Permisos, criterios de inclusión y descripción de las muestras y los ensayos

El presente trabajo cuenta con la autorización del Comité de Bioética de la Universidad de Extremadura (Nº Registro: 116/2016, Anexo I) y se ha desarrollado de acuerdo con los principios éticos establecidos en la Declaración de 1975 de Helsinki y sus revisiones posteriores. Todos los participantes firmaron un consentimiento previo a su participación.

La obtención de la información sanitaria necesaria se realizó mediante una exploración física de los pies y la cumplimentación de un cuestionario de salud (Anexo II). Los criterios de inclusión fueron: ser mayor de edad, no tener enfermedades diagnosticadas que puedan alterar la estructura y/o composición de la uña, no tomar medicación que esté descrito que altere la estructura y/o composición de la uña, seguir la dieta mediterránea y no haber empleado esmaltes, lacas o cualquier otra sustancia sobre las láminas ungueales del primer dedo de los pies.

Para el desarrollo del contenido de este capítulo se trabajó con varias muestras diferentes y se realizaron distintos tipos de ensayos (Tabla 14).

Tabla 14. Descripción de las distintas muestras empleadas para el desarrollo de los diferentes ensayos de determinación de la consistencia ungueal mediante el MCU.

Tipos de muestras						
		Testigos	Participante de referencia	Jóvenes	Adultos	Testigos
Tipo de ensayo		Repeticiones independientes	Repeticiones independientes	Medida única	Medida única	Repeticiones independientes
n		40	80	66	66	252
Condiciones de Tª y HR		constantes	constantes	constantes	constantes	variables
Nº de participantes		2	2	66	66	2
Edad media (años)		np	49.00±1.41	21.48±1.24	52.00±5.08	np

Género	np	0 hombres	32 hombres	32 hombres	np
	np	2 mujeres	34 mujeres	34 mujeres	np
Consistencia	1 "blanda"	1 blanda	20 blandas	20 blandas	1 "blanda"
ungueal	1 "dura"	1 dura	46 duras	46 duras	1 "dura"

n: tamaño muestral, Tª: temperatura, HR: humedad relativa, constantes: condiciones de Tª entre 21°C y 23°C y HR entre 35-40%, variables: condiciones de Tª entre 15.6°C y 24.3°C y HR entre 57%-33%, Nº: número, np: no procede, "": consistencia de los testigos asimilable a.

Como testigos inertes para los ensayos de repetición con el MCU en condiciones ambientales constantes (Tª entre 21 y 23°C y HR entre 35-40%) se emplearon los bloques de calibración de durómetros de tipo shore A (Yfyiqi, Shenzhen, China), en concreto se trabajó con los bloques rojo (70, denominado como testigo asimilable a blando) y gris (87, denominado como testigo asimilable a duro) realizándose 20 repeticiones con cada testigo (Figura 18).



Figura 18. Bloques de calibración de durómetros de tipo shore A. A: kit con los distintos bloques disponibles. B: bloques rojo (70) y gris (87) utilizados en los ensayos de repeticiones con testigos, siendo el bloque gris más rígido que el rojo.

También se emplearon estos dos testigos en los ensayos de repetición en condiciones ambientales variables, seleccionando del total de 252 medidas las 10 primeras obtenidas a baja T^a (entre 15.6 y 15.9°C y HR entre 57 y 55%) y las 10 últimas obtenidas a alta T^a (entre 23.5 y 24.3°C y HR entre 34 y 33%) para cada uno de los testigos empleados (Tabla 14).

Dos mujeres pertenecientes a la misma franja de edad (49 ± 1.41 años) y con diferente consistencia ungueal (dura y blanda) se utilizaron como referencia en los ensayos de medidas de repetición *in vivo*, realizándose 40 medidas con cada una de ellas: 20 en el pie derecho y 20 en el pie izquierdo. Por último, un total de 132 personas pertenecientes a dos franjas de edad diferentes (jóvenes: 21.48 ± 1.24 y adultos: 52.00 ± 5.08), con una proporción por género similar (32 hombres y 34 mujeres) y con distintas consistencias ungueales (20 uñas de consistencia blanda y 46 uñas de consistencia dura) participaron en el ensayo de medida única *in vivo* con el MCU (Tabla 14).

Determinación de la consistencia ungueal

a) Método de referencia para la determinación de la consistencia ungueal

La determinación de la consistencia ungueal se realizó *in vivo* tras atemperar el pie ejerciendo presión manualmente sobre los bordes en el eje latero-medial y dorso-ventral del aparato ungueal del primer dedo del pie, siguiendo la metodología descrita previamente en (Pérez Pico *et al.*, 2017).

b) Determinación de la consistencia ungueal mediante el MCU

Toda la información detallada sobre el diseño y funcionamiento del MCU se recoge en el Anexo III. En esencia, se trata de un dispositivo con una célula de carga dispuesta sobre un brazo flexible (Figura 19) que permite obtener medidas numéricas sobre la fuerza ejercida en la lámina ungueal (hasta un máximo de 1000gf) y el desplazamiento causado por su deformación. Por tanto, permite medir el

comportamiento mecánico de la lámina ungueal con el objetivo final de aportar a los profesionales de salud en general, y de la podología en particular, una herramienta para la determinación la consistencia ungueal de forma objetiva, cuantificable y sencilla.

Para la utilización del MCU, el participante debe disponerse sentado en una silla regulable en altura y con respaldo, que le permita mantener una postura cómoda y estable, con la espalda correctamente apoyada, las dos rodillas flexionadas formado un ángulo de 90 grados y ambas superficies plantares completamente apoyadas, una en el suelo y la otra en el dispositivo. Es importante que el participante no hable, coma o beba y mantenga un estado relajado durante la realización de la medida, para evitar posibles movimientos indeseados que puedan alterar las mediciones. Todas las mediciones realizadas con participantes se llevaron a cabo en condiciones de Tª y humedad controladas (23ºC y 35% de HR), dejando atemperar los pies antes de iniciar cada medición y colocando el brazo flexible con la célula de carga sobre el borde libre de la lámina ungueal, en la región central y perpendicular a la lúnula (Figura 19).

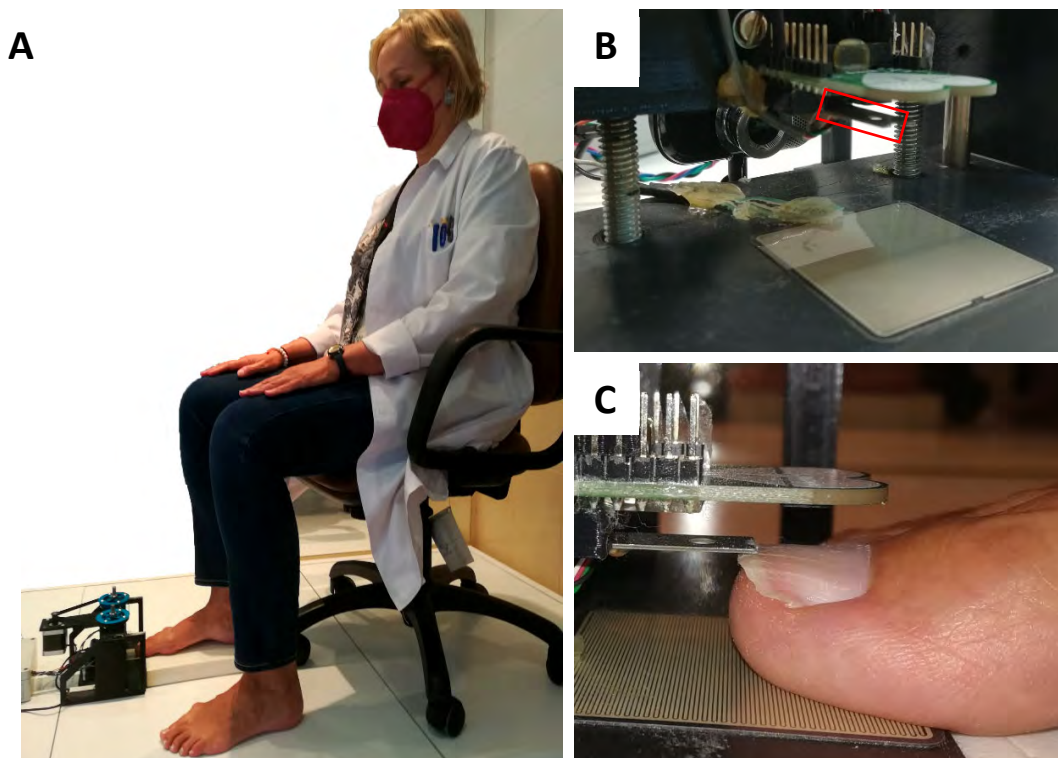


Figura 19. Posicionamiento del participante para la determinación de la consistencia ungueal mediante el MCU. A: disposición del participante en sedestación con las piernas flexionadas a 90º y ambas superficies plantares apoyadas, la derecha en el MCU y la izquierda en el suelo. B: detalle del brazo flexible (recuadro rojo). C: colocación de la lámina ungueal con la célula de carga del MCU, en la región central de la lámina ungueal y perpendicular a la lúnula.

Tratamiento estadístico y variables de estudio

El tratamiento estadístico se realizó con el software estadístico SPSS para Windows, versión 27.0 (IBM, Armonk, NY, Estados Unidos). El análisis de la normalidad se realizó mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Para comparar las distribuciones obtenidas en función de la consistencia ungueal, así como para el análisis del comportamiento de las variables cuantitativas consideradas con respecto a la consistencia ungueal y al resto de las variables cualitativas se utilizó la prueba de Wilcoxon de suma de rangos para dos muestras independientes. Los análisis de correlación entre las variables cuantitativas se realizaron mediante la prueba de correlación de Pearson. En todos los análisis realizados el nivel de significación fue de 0.05.

Puesto que la fuerza medida por la célula de carga es prácticamente idéntica a la fuerza ejercida por el brazo flexible, el desplazamiento es dependiente de la fuerza ejercida (Traver *et al.*, 2021). Como la posición inicial y el área de contacto del brazo flexible son constantes para cada participante, un análisis de la variación de la posición (desplazamiento) en función de la fuerza ejercida permite estudiar el comportamiento mecánico en función de las características de cada material. En consecuencia, se crearon 10 variables cuantitativas de posición denominadas P1 a P10 que reflejan la posición del brazo flexible. Estas variables se calcularon restando la posición final (en milímetros) de la posición inicial al incrementar 100 gf la fuerza ejercida por el brazo flexible. De forma que, la variable P1 representa el desplazamiento entre la posición P0 y la posición P1 generado al incrementar 100gf la fuerza inicial, y así sucesivamente para el resto de las variables hasta P10. A partir de las variables de posición P se calcularon las variables de desplazamiento denominadas D1 a D10 que reflejan el desplazamiento del brazo flexible. Estas variables son el resultado de restar el valor de las variables desde P1 a P10 a la posición inicial y reflejan la distancia total (en milímetros) desde cualquier posición (de P1 a P10) hasta la posición inicial (Figura 20). Otra de las variables analizadas fue el coeficiente alfa que, en el contexto de un modelo viscoelástico de orden fraccionario, puede ser clave en la discriminación entre uñas de consistencia dura y uñas de consistencia blanda (Traver *et al.*, 2021). Para el cálculo de alfa (α) se empleó el software matemático Matlab versión R2021a (Mathworks, Natick, MA, Estados Unidos)

implementado para el cálculo mediante el algoritmo: $M=(1/b)/s^\alpha+k/b$. Por último, dentro de las variables cuantitativas analizadas se consideraron el tiempo máximo (en segundos) y la posición máxima (en milímetros) alcanzada al finalizar la medida al alcanzar los 1000gf.

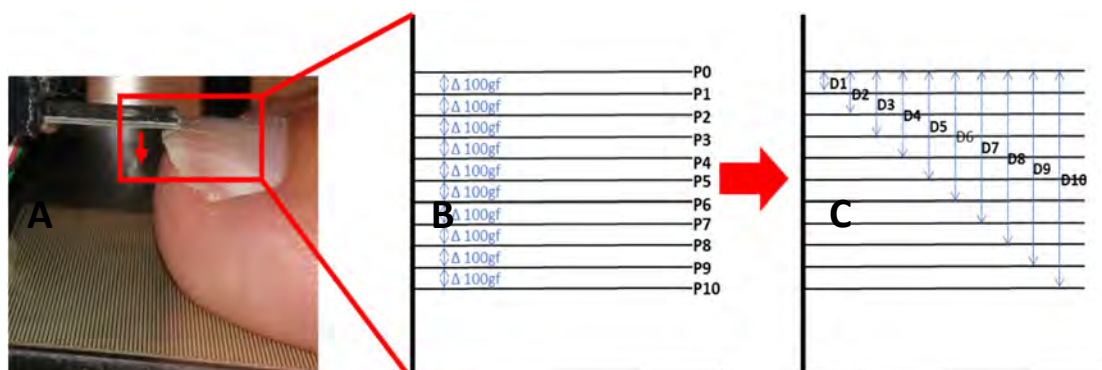


Figura 20. Cálculo de las variables de posición (P) y desplazamiento (D). A: disposición inicial del MCU sobre la lámina ungueal. B: cálculo de las variables de posición (P) restando la posición final (Px) de la posición inicial (Px-1) al incrementar 100 gf la fuerza ejercida por el brazo flexible. C: cálculo de las variables de desplazamiento (D) restando la posición final (Px) de la posición inicial (P0).

En el apartado de las variables cualitativas dicotómicas se consideraron: la consistencia (uñas de consistencia dura y uñas de consistencia blanda), el género (hombre y mujer), la edad (joven y adulto) y el pie en el que se realizó la medida (pie derecho y pie izquierdo).

RESULTADOS

Se realizaron un total de 254 pruebas para analizar la normalidad de cada variable en función de la consistencia ungueal, el pie en el que se realizó la medida, el género del participante y las condiciones ambientales. Las variables no siguieron la distribución normal en el 14.96% de las pruebas realizadas (n=38) para la prueba de Kolmogórov-Smirnov y en el 23.62% (n=60) para la prueba de Shapiro-Wilk, por lo que se emplearon pruebas no paramétricas para el análisis estadístico, excepto en el caso de las correlaciones, en el que todas las variables siguieron la distribución normal y no se requirió de comparación entre ensayos analizados con pruebas paramétricas y no paramétricas.

Desarrollo de un dispositivo para la determinación de la consistencia ungueal

Se desarrolló y patentó un dispositivo para la determinación de la consistencia ungueal *in vivo* MCU, en colaboración con un grupo de ingenieros de la Universidad de Extremadura (Inés Tejado Balsera, José Emilio Traver Becerra, Blas Manuel Vinagre Jara) y de la Universidad de Castilla la Mancha (Javier Prieto Arranz y Vicente Feliu Batlle), con número de publicación de patente de invención con examen sustantivo de 2784799 y con fecha de publicación de la concesión de 16 de abril de 2021 (Anexo III).

El resultado de la medición es un archivo de texto en el que se recogen, cada 10 milisegundos, la fuerza ejercida en gramos-fuerza y la posición ocupada en milímetros (previa conversión matemática) (Figura 21).

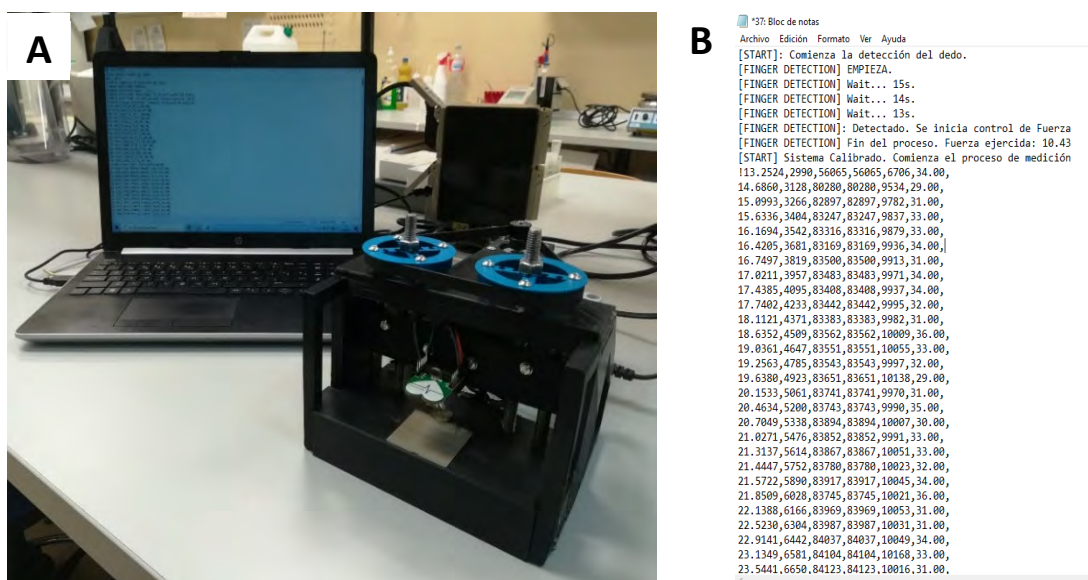


Figura 21. Fotografía del MCU y archivo resultante de la medición. A: dispositivo MCU en conexión con un ordenador desde el que se controla su funcionamiento y en el que se pueden visualizar y descargar las medidas obtenidas. B: captura de imagen de un archivo de texto generado por el MCU tras medir la consistencia ungueal.

A modo de ejemplo, en la Figura 22 se ilustran gráficamente los resultados obtenidos del MCU para dos de las mediciones realizadas con las participantes de referencia, representando la fuerza frente al desplazamiento. Como se puede observar, aunque los coeficientes de determinación indican que el ajuste lineal mediante mínimos cuadrados es bueno con valores superiores a 0.98, para las fuerzas comprendidas entre aproximadamente 200 y 700gf los desplazamientos están por debajo de la línea de tendencia, mientras que, para las fuerzas iniciales y finales los desplazamientos son

superiores. Además, para estas dos participantes, las rectas de ajuste lineal muestran que la uña de consistencia dura tiene una pendiente mayor que la uña de consistencia blanda, por tanto, para una misma fuerza ejercida el desplazamiento en la uña dura es menor que en la uña blanda.

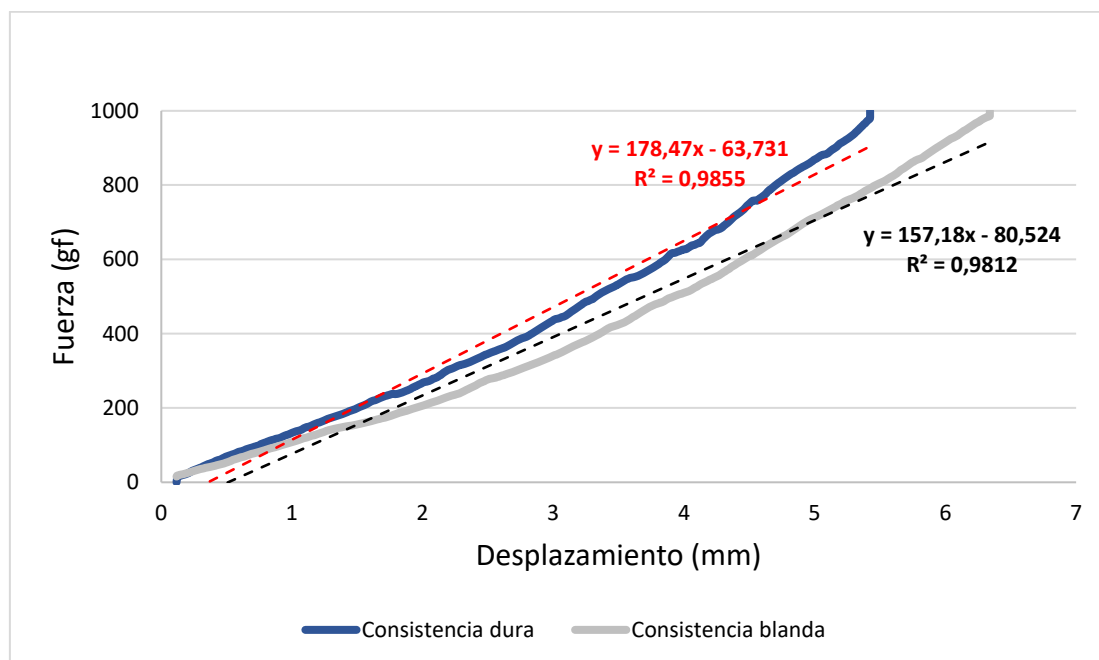


Figura 22. Ejemplo de dos diagramas de dispersión pertenecientes a dos mujeres en la misma franja de edad y distinta consistencia ungueal (participantes de referencia), representando la fuerza frente al desplazamiento, el ajuste lineal y el coeficiente de determinación. R²: coeficiente de determinación, gf: gramo-fuerza, mm: milímetro.

Ensayos de repeticiones con testigos y participantes de referencia

En una primera fase del análisis, con el objetivo de determinar en términos generales si el MCU detectaba diferencias atendiendo a la consistencia ungueal, se procedió al análisis comparativo de las distribuciones de las variables de desplazamiento (D1 a D10), tanto en los ensayos con testigos como con los participantes de referencia. En los dos ensayos comparados las distribuciones fueron diferentes (p-valores ≤ 0.002) (Tabla 15).

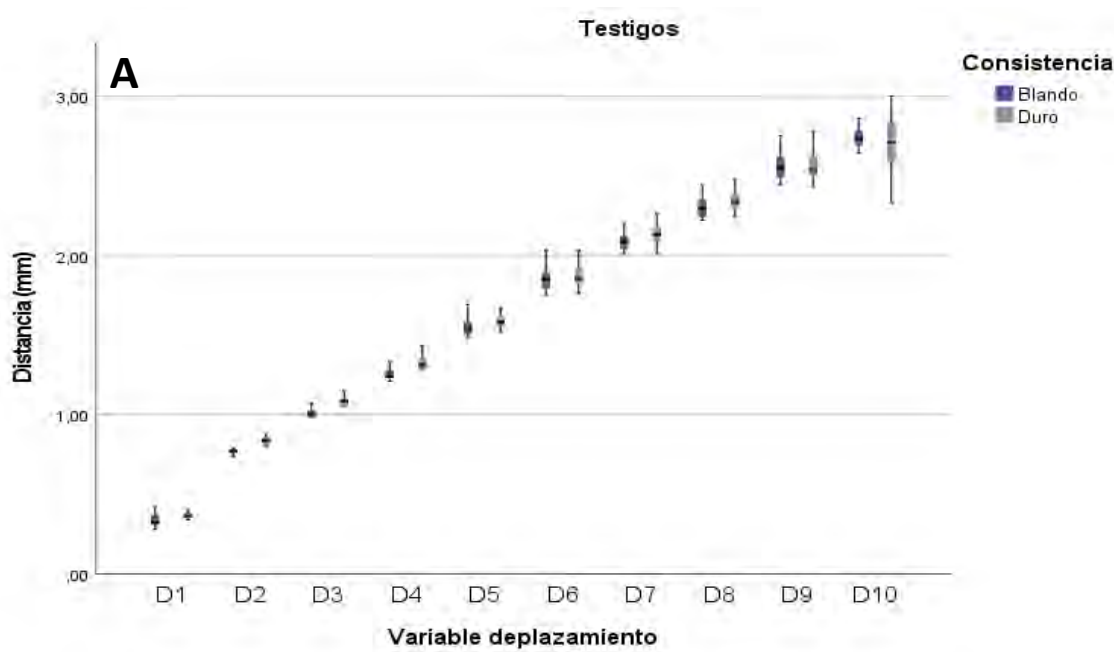
Tabla 15. Análisis estadístico mediante la prueba de Wilcoxon de suma de rangos para dos muestras independientes de las distribuciones obtenidas en los distintos tipos de ensayo.

Tipo de ensayo	Consistencia ungueal	p-valor
Testigos	Blanda	0.002*

	Dura	
	Blanda	
Participante de referencia	Dura	$<0.001^*$

*: diferencia significativa.

Posteriormente, se procedió al análisis descriptivo de las variables. Puesto que las variables de desplazamiento (D1 a D10) representan la distancia entre la posición inicial y una posición concreta entre P1 y P10, las medianas de estas variables fueron mayores a mayor desplazamiento, es decir, las medianas de D10 fueron mayores que las medianas de D1, tanto en el ensayo con testigos como en el realizado con participantes de referencia, siendo mayores los desplazamientos en este último ensayo, pues el grosor de los dedos y su capacidad para desplazarse bajo la fuerza ejercida fue mayor que la observada en los testigos. En la mayoría de las variables analizadas, las medianas fueron mayores en los testigos y participantes de referencia con uñas de consistencia dura, mientras que la dispersión de las variables relativas a consistencias blandas fue mayor que la de las consistencias duras. Además, las dispersiones fueron mayores en las variables con mayor desplazamiento (D10) que en las variables con menor desplazamiento (D1), independientemente de la consistencia (Figura 23).



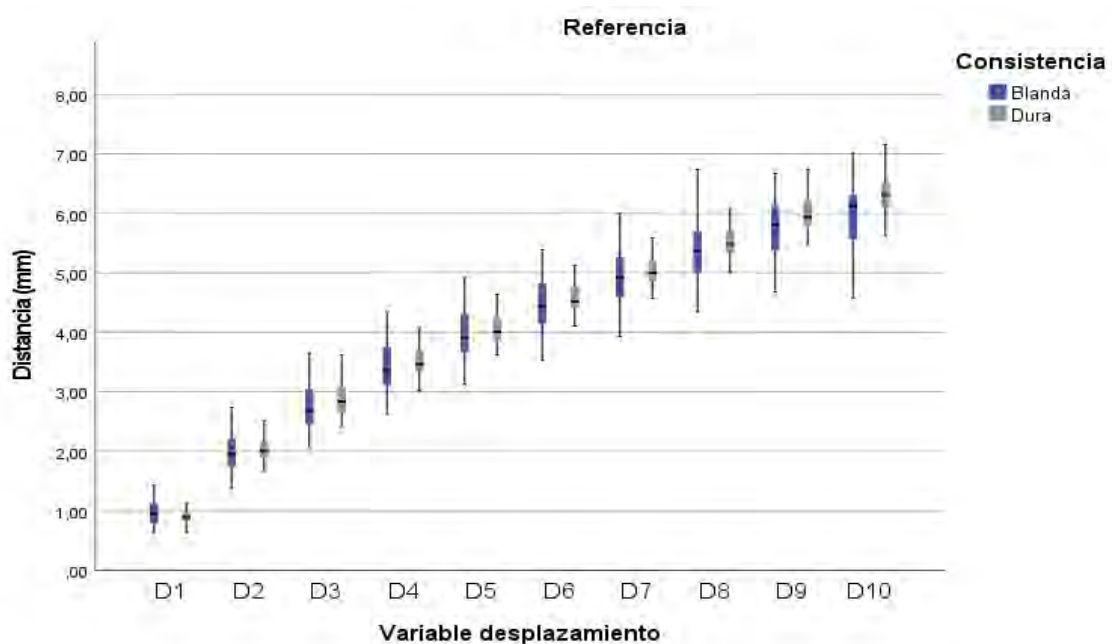


Figura 23. Gráficos de cajas de las variables de desplazamiento (D1 a 10) en función de la consistencia. A: ensayo de repeticiones con testigos. B: ensayo de repeticiones con participantes de referencia.

Finalmente, se procedió al análisis comparativo punto a punto de las diferentes variables. Un total de 5 variables de desplazamiento mostraron diferencias estadísticamente significativas tanto en los ensayos con testigos (D1 a D5; p-valores ≤ 0.041) como en los realizados con participantes de referencia (D3, D4, D6, D9 y D10; p-valores ≤ 0.050), de forma que los rangos promedio del testigo asimilable a duro y de las uñas de consistencia dura fueron mayores que los obtenidos del testigo asimilable a blando y de las uñas de consistencia blanda. Sin embargo, en el ensayo con los testigos se puede apreciar que las variables con diferencias significativas fueron las 5 variables iniciales, de forma que una vez superada la distancia de D5 las variables no mostraron diferencias llegando incluso a invertirse la tendencia, mientras que en el ensayo con los participantes de referencia todas las variables de desplazamiento, excepto D2, mostraron diferencias significativas o indicios de significación (p-valores entre 0.05 y 0.1). Además, en los ensayos con participantes de referencia, las variables posición y tiempo máximos mostraron también diferencias significativas (p-valores ≤ 0.015), siendo mayores los rangos promedios obtenidos para el testigo asimilable a duro y las uñas de consistencia dura. El análisis de la variable alfa en los ensayos con los participantes de referencia no mostró diferencias (p-valor=0.939) (Tabla 16 y Figura 24).

Tabla 16. Análisis estadístico mediante la prueba de Wilcoxon de suma de rangos para dos muestras independientes de las variables analizadas en los ensayos de repeticiones con testigos y con participantes de referencia.

Variable	Consistencia	Testigos			Referencia		
		Rango promedio	SR	p-valor	Rango promedio	SR	p-valor
D1	Blando	15.80	316	0.011*	40.30	1612	0.939
	Duro	25.20	504		40.70	1628	
D2	Blando	12.05	241	<0.001*	36.38	1455	0.112
	Duro	28.95	579		44.63	1785	
D3	Blando	12.60	252	<0.001*	35.36	1414	0.048*
	Duro	28.40	568		45.64	1825	
D4	Blando	14.48	289	0.001*	34.88	1395	0.030*
	Duro	26.53	530		46.13	1845	
D5	Blando	16.73	334	0.041*	35.67	1427	0.063
	Duro	24.28	485		45.33	1813	
D6	Blando	19.38	387	0.542	35.40	1416	0.050*
	Duro	21.63	432		45.60	1824	
D7	Blando	18.20	364	0.212	36.13	1445	0.092
	Duro	22.80	456		44.88	1795	
D8	Blando	18.75	375	0.342	36.09	1443	0.089
	Duro	22.25	445		44.91	1796	
D9	Blando	21.73	434	0.507	35.31	1412	0.046*
	Duro	19.27	385		45.69	1827	
D10	Blando	22.43	448	0.297	33.48	1339	0.007*
	Duro	18.58	371		47.53	1901	
Tiempo máximo	Blando	22.65	453	0.245	34.15	1366	0.015*
	Duro	18.35	367		46.85	1874	
Posición máxima	Blando	22.48	449	0.285	33.40	1336	0.006*
	Duro	18.52	370		47.60	1904	
Alfa	Blando	np	np	np	40.70	1628	0.939
	Duro	np	np		40.30	1612	

SR: suma de rangos, *: diferencia significativa, np: el análisis no procede.

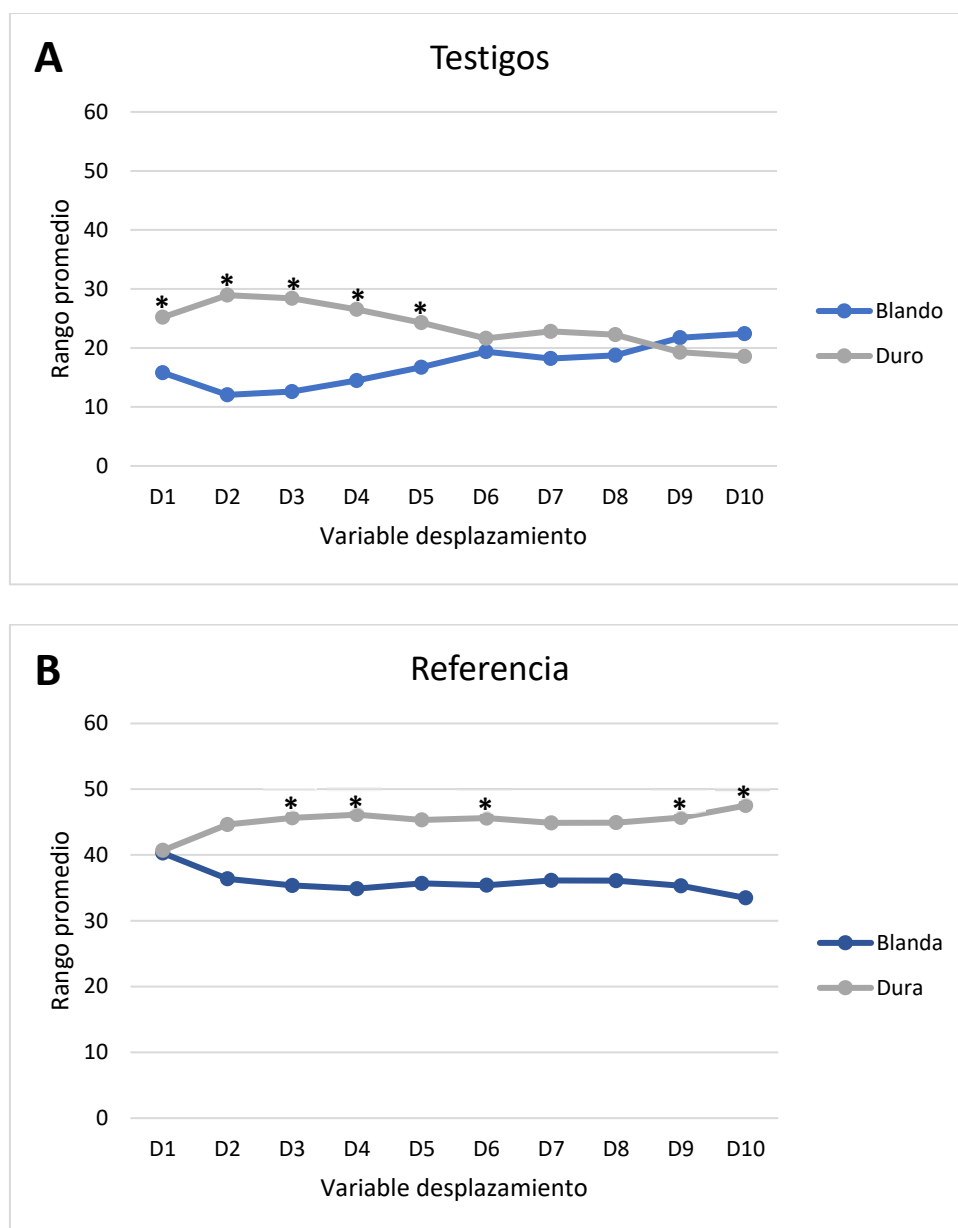


Figura 24. Gráficos de dispersión de los rangos promedio de las variables de desplazamiento (D1 a 10) en función de la consistencia. A: ensayo de repeticiones con testigos. B: ensayo de repeticiones con participantes de referencia. *: diferencia significativa.

Ensayos de medida única con jóvenes y adultos

El análisis comparativo general de las distribuciones de las variables atendiendo a la consistencia ungueal mostró diferencias significativas entre los ensayos con jóvenes y con adultos (p -valores ≤ 0.008) (Tabla 17).

Tabla 17. Análisis estadístico mediante la prueba de Wilcoxon de suma de rangos para dos muestras independientes de las distribuciones obtenidas en los distintos tipos de ensayo.

Tipo de ensayo	Consistencia ungueal	p-valor
Jóvenes	Blanda	<0.001*
	Dura	
Adultos	Blanda	0.008*
	Dura	

*: diferencia significativa.

El análisis estadístico punto a punto de las variables analizadas en los ensayos de medida única con jóvenes y con adultos se realizó en función de tres variables cualitativas dicotómicas: la consistencia ungueal, el pie en el que se realizó la medida y el género del participante.

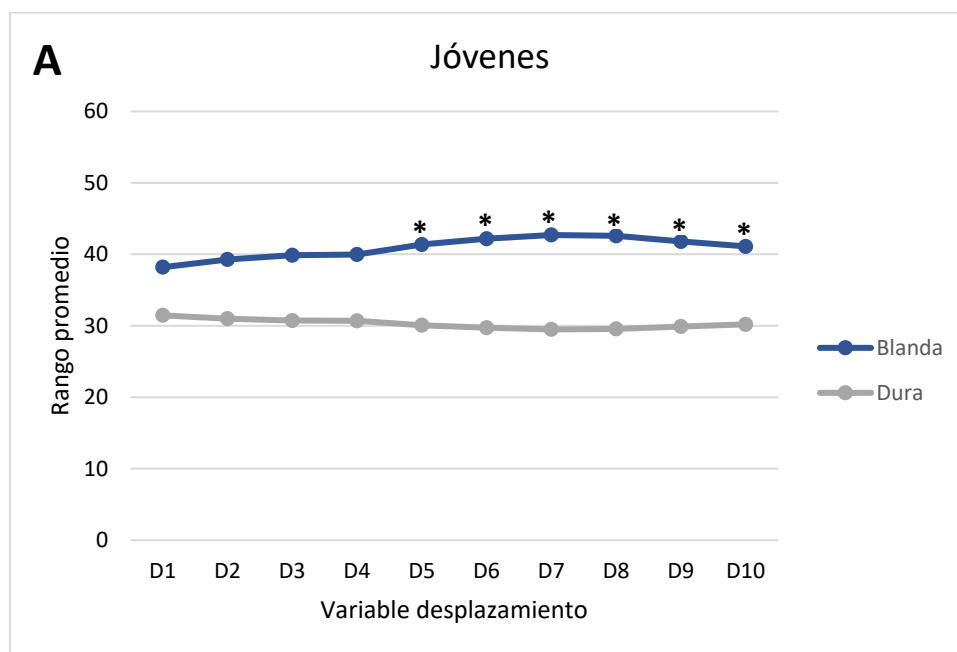
En relación con la consistencia ungueal, los resultados obtenidos fueron dispares. Así, mientras que entre los jóvenes se pudieron establecer diferencias estadísticamente significativas en un total de 7 variables, entre las que se encontraban las 6 últimas variables de desplazamiento (D6 a D10; p-valores \leq 0.034) e indicios de significación en otras 2 variables más de desplazamiento (D3 y D4; p-valores \leq 0.075), dentro del grupo de los adultos no se pudo establecer ninguna diferencia en función de la consistencia (Tabla 18 y Figura 25). Además, los resultados obtenidos con los jóvenes difieren de los obtenidos con los participantes de referencia, pues en los primeros los mayores rangos promedio se observaron en las uñas de consistencia dura mientras que en los segundos, los mayores rangos promedio correspondieron a las uñas de consistencia blanda. No obstante, y al igual que los resultados obtenidos con los participantes de referencia, entre los jóvenes se observaron diferencias en la variable posición máxima (p-valor=0.035), pero no en el tiempo máximo ni en alfa (Tabla 16 y Tabla 18).

Tabla 18. Análisis estadístico mediante la prueba de Wilcoxon de suma de rangos para dos muestras independientes de las variables analizadas en los ensayos de medida única con jóvenes y adultos en función de la consistencia ungueal.

Variable	Consistencia ungueal	Jóvenes			Adultos		
		Rango promedio	SR	p-valor	Rango promedio	SR	p-valor
D1	Blanda	38.20	764	0.190	31.30	626	0.539
	Dura	31.46	1447		34.46	1585	
D2	Blanda	39.28	785	0.107	33.40	668	0.978
	Dura	30.99	1425		33.54	1543	
D3	Blanda	39.88	797	0.075	33.83	676	0.928
	Dura	30.73	1413		33.36	1534	

D4	Blanda	39.98	799	0.071	34.05	681	0.878
	Dura	30.68	1411		33.26	1530	
D5	Blanda	41.38	827	0.028*	34.13	682	0.862
	Dura	30.08	1383		33.23	1528	
D6	Blanda	42.18	843	0.015*	34.48	689	0.786
	Dura	29.73	1367		33.08	1521	
D7	Blanda	42.70	854	0.010*	35.45	709	0.586
	Dura	29.50	1357		32.65	1502	
D8	Blanda	42.58	851	0.011*	36.10	722	0.468
	Dura	29.55	1359		32.37	1489	
D9	Blanda	41.80	836	0.021*	36.63	732	0.383
	Dura	29.89	1375		32.14	1478	
D10	Blanda	41.10	822	0.034*	36.83	736	0.353
	Dura	30.20	1389		32.05	1474	
Tiempo máximo	Blanda	34.70	694	0.738	37.17	743	0.305
	Dura	32.98	1517		31.90	1467	
Posición máxima	Blanda	41.08	821	0.035*	36.80	736	0.357
	Dura	30.21	1389		32.07	1475	
Alfa	Blanda	33.13	662	0.917	29.73	594	0.292
	Dura	33.66	1548		35.14	1616	

SR: suma de rangos, *: diferencia significativa.



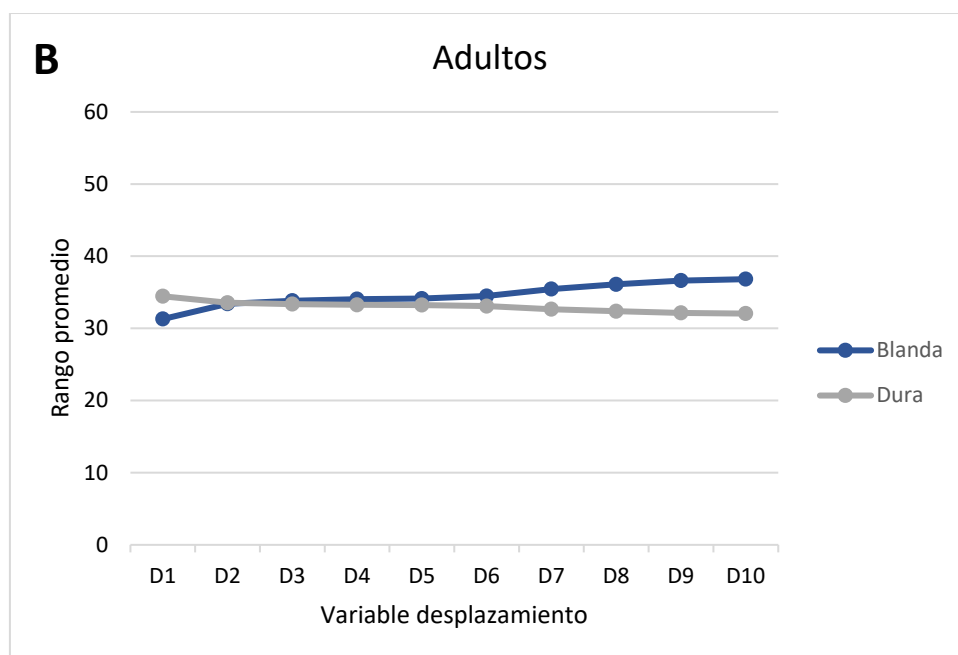


Figura 25. Gráficos de dispersión de los rangos promedio de las variables de desplazamiento (D1 a 10) en función de la consistencia ungueal. A: ensayo de medida única con jóvenes. B: ensayo de medida única con adultos. *: diferencia significativa.

Respecto a los resultados obtenidos atendiendo al pie en el que se realizó la medida, los resultados fueron uniformes: ninguna de las variables mostró diferencia significativa alguna, ni en las variables de desplazamiento, ni en el tiempo y posición máximas, ni en alfa (Tabla 19 y Figura 26).

Tabla 19. Análisis estadístico mediante la prueba de Wilcoxon de suma de rangos para dos muestras independientes de las variables analizadas en los ensayos de medida única con jóvenes y adultos en función del pie.

Variable	Pie	Jóvenes			Adultos		
		Rango promedio	SR	p-valor	Rango promedio	SR	p-valor
D1	Derecho	29.36	969	0.080	32.02	1056	0.530
	Izquierdo	37.64	1242		34.98	1154	
D2	Derecho	31.36	1035	0.366	32.64	1077	0.715
	Izquierdo	35.64	1176		34.36	1134	
D3	Derecho	31.68	1045	0.442	33.45	1104	0.985
	Izquierdo	35.32	1165		33.55	1107	
D4	Derecho	32.02	1056	0.530	33.55	1107	0.985
	Izquierdo	34.98	1154		33.45	1104	
D5	Derecho	31.98	1055	0.521	34.26	1130	0.748
	Izquierdo	35.02	1155		32.74	1080	
D6	Derecho	31.68	1045	0.442	34.14	1126	0.788
	Izquierdo	35.32	1165		32.86	1084	

D7	Derecho	32.03	1057	0.534	34.38	1134	0.710
	Izquierdo	34.97	1154		32.62	1076	
D8	Derecho	31.73	1047	0.453	34.17	1127	0.778
	Izquierdo	35.27	1164		32.83	1083	
D9	Derecho	32.20	1062	0.581	34.45	1137	0.686
	Izquierdo	34.80	1148		32.55	1074	
D10	Derecho	31.86	1051	0.489	33.64	1110	0.954
	Izquierdo	35.14	1159		33.36	1101	
Tiempo máximo	Derecho	31.67	1045	0.438	33.89	1118	0.868
	Izquierdo	35.33	1066		33.11	1092	
Posición máxima	Derecho	31.86	1051	0.489	33.61	1109	0.964
	Izquierdo	35.14	1159		33.39	1102	
Alfa	Derecho	32.71	1079	0.739	30.71	1013	0.238
	Izquierdo	34.29	1131		36.29	1197	

SR: suma de rangos, *: diferencia significativa, np: el análisis no procede.

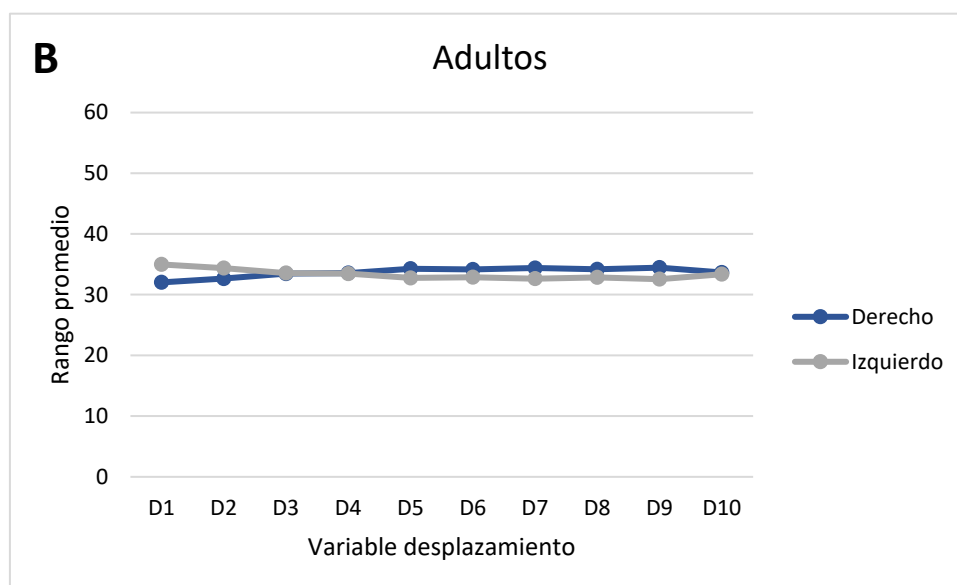
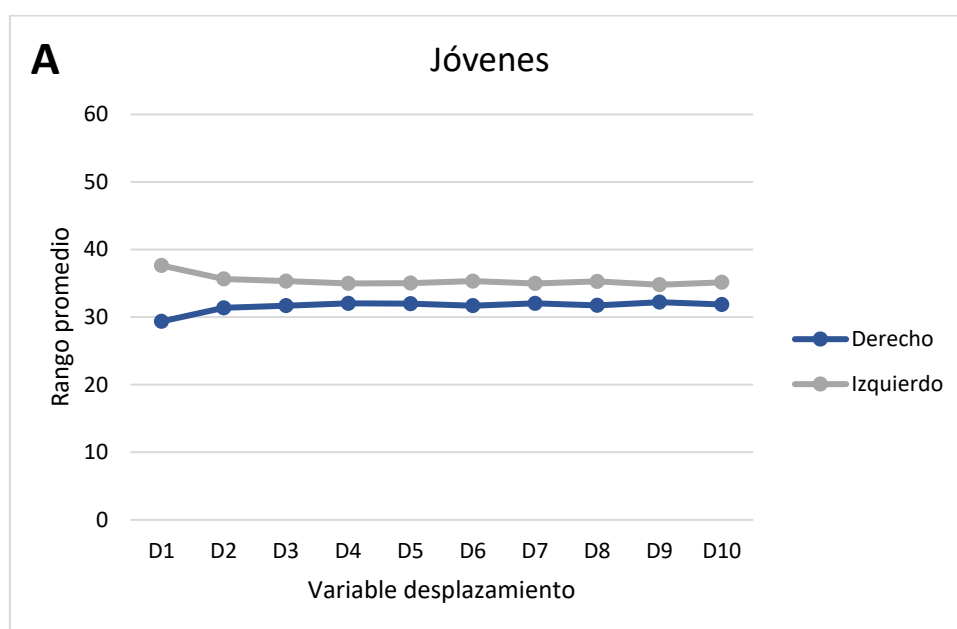


Figura 26. Gráficos de dispersión de los rangos promedio de las variables de desplazamiento (D1 a 10) en función del pie. A: ensayo de medida única con jóvenes. B: ensayo de medida única con adultos.

En cuanto al análisis de las variables entre los jóvenes y entre los adultos en función del género también mostró resultados uniformes pues en ninguna de las variables analizadas se observaron diferencias significativas atendiendo a esta característica (Tabla 20 y Figura 27).

Tabla 20. Análisis estadístico mediante la prueba de Wilcoxon de suma de rangos para dos muestras independientes de las variables analizadas en los ensayos de medida única con jóvenes y adultos en función del género.

Variable	Género	Jóvenes			Adultos		
		Rango promedio	SR	p-valor	Rango promedio	SR	p-valor
D1	Mujer	33.47	1138	0.990	29.75	952	0.124
	Hombre	33.53	1073		37.03	1259	
D2	Mujer	33.15	1127	0.878	30.77	984	0.261
	Hombre	33.88	1084		36.07	1226	
D3	Mujer	32.22	1095	0.577	31.00	992	0.305
	Hombre	34.86	1115		35.85	1219	
D4	Mujer	31.68	1077	0.426	31.30	1001	0.366
	Hombre	35.44	1134		35.57	1209	
D5	Mujer	30.94	1052	0.264	31.33	1002	0.373
	Hombre	36.22	1159		35.54	1208	
D6	Mujer	30.25	1028	0.156	31.23	999	0.352
	Hombre	36.95	1182		35.63	1211	
D7	Mujer	29.96	1018	0.122	31.56	1010	0.426
	Hombre	37.27	1192		35.32	1201	
D8	Mujer	29.91	1017	0.117	32.08	1026	0.559
	Hombre	37.31	1194		34.84	1184	
D9	Mujer	30.31	1030	0.164	32.41	1037	0.653
	Hombre	36.89	1180		34.53	1174	
D10	Mujer	30.54	1038	0.197	31.86	1019	0.501
	Hombre	36.64	1172		35.04	1191	
Tiempo máximo	Mujer	30.76	1046	0.233	32.17	1029	0.586
	Hombre	36.41	1165		34.75	1181	
Posición máxima	Mujer	30.57	1039	0.202	31.86	1019	0.501
	Hombre	36.61	1171		35.04	1191	
Alfa	Mujer	36.81	1251	0.149	30.19	966	0.174
	Hombre	29.98	959		36.62	1245	

SR: suma de rangos, *: diferencia significativa.

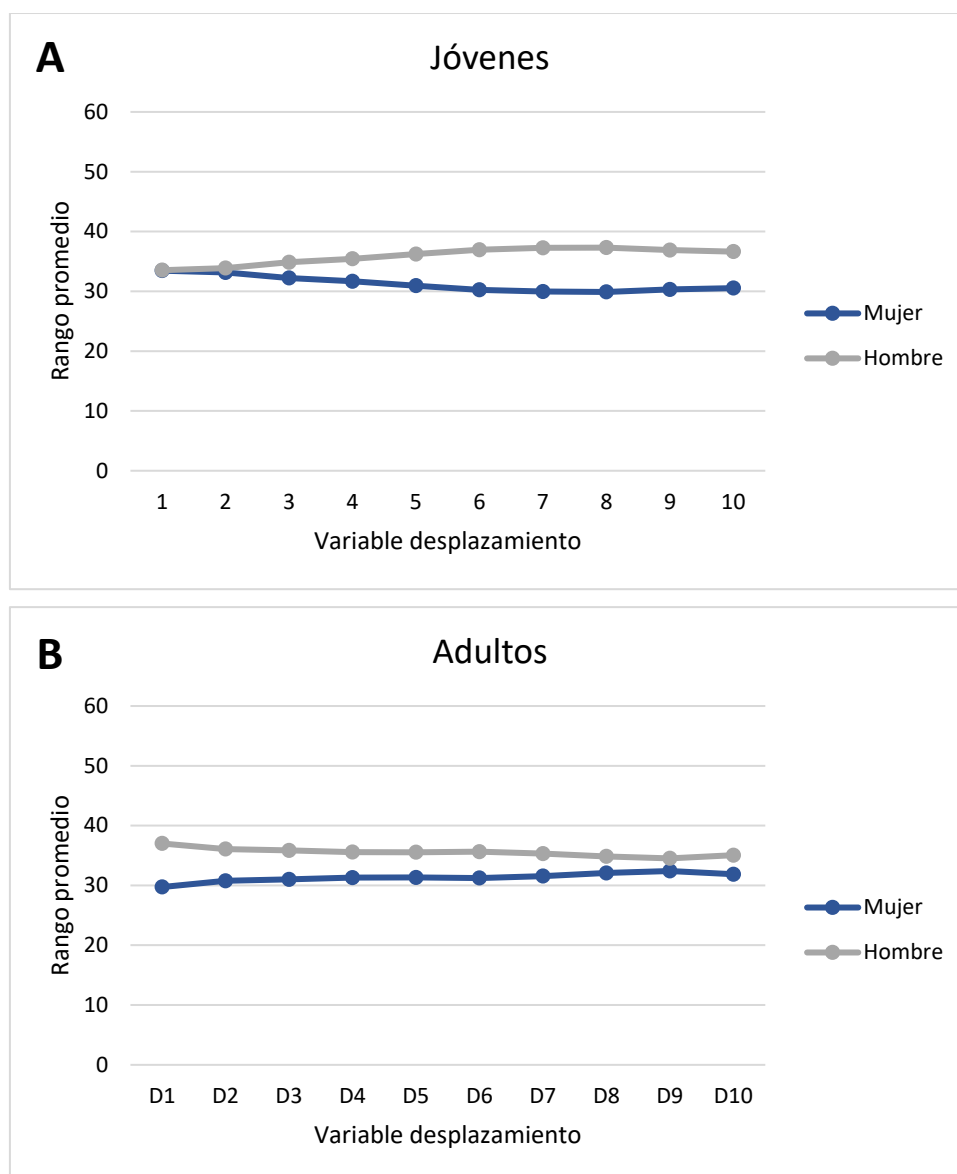


Figura 27. Gráficos de dispersión de los rangos promedio de las variables de desplazamiento (D1 a 10) en función del género. A: ensayo de medida única con jóvenes. B: ensayo de medida única con adultos.

Ensayos de repetición con testigos y condiciones variables de T^a y HR

Al analizar descriptivamente las variables de desplazamiento (D1 a D10) en función de las condiciones de T^a y HR, se observó al igual que en el ensayo de repeticiones con testigos, que las medianas de las variables con mayores desplazamientos fueron superiores a las medianas de variables con desplazamientos menores, es decir, que las medianas observadas en D10 fueron mayores que las medianas de D1. También se observó que las medianas en condiciones de alta T^a fueron mayores que las medianas a baja T^a, con independencia del tipo de testigo. En general,

las dispersiones de las variables con menor desplazamiento fueron mayores a alta T^a , mientras que en las variables con mayor desplazamiento las dispersiones fueron mayores a baja T^a . Sin embargo, las dispersiones de las variables fueron mayores en las variables de mayor desplazamiento en comparación con las variables de menor desplazamiento, independientemente del testigo analizado (Figura 28).

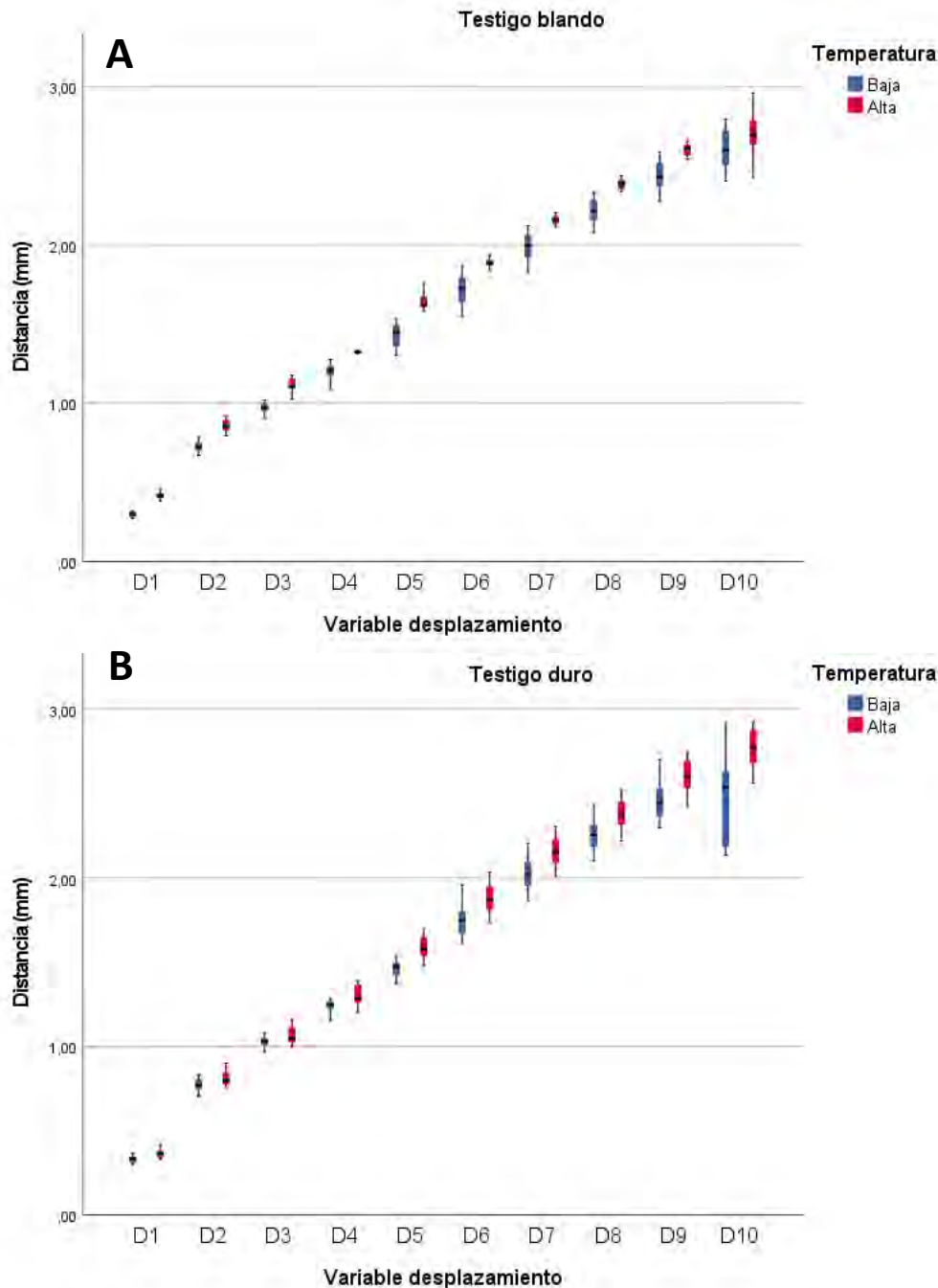


Figura 28. Gráficos de cajas de las variables de desplazamiento (D1 a 10) en función de las condiciones de T^a y HR. A: ensayo de repeticiones con testigo de consistencia asimilable a blando. B: ensayo de repeticiones con testigo de consistencia asimilable a duro.

Los cambios de T^a y HR registrados durante la realización del ensayo de repeticiones con testigos en condiciones ambientales variables oscilaron entre los 15.6°C y el 57% de HR y los 24.3°C y 33% de HR (Tabla 14 y Figura 29).

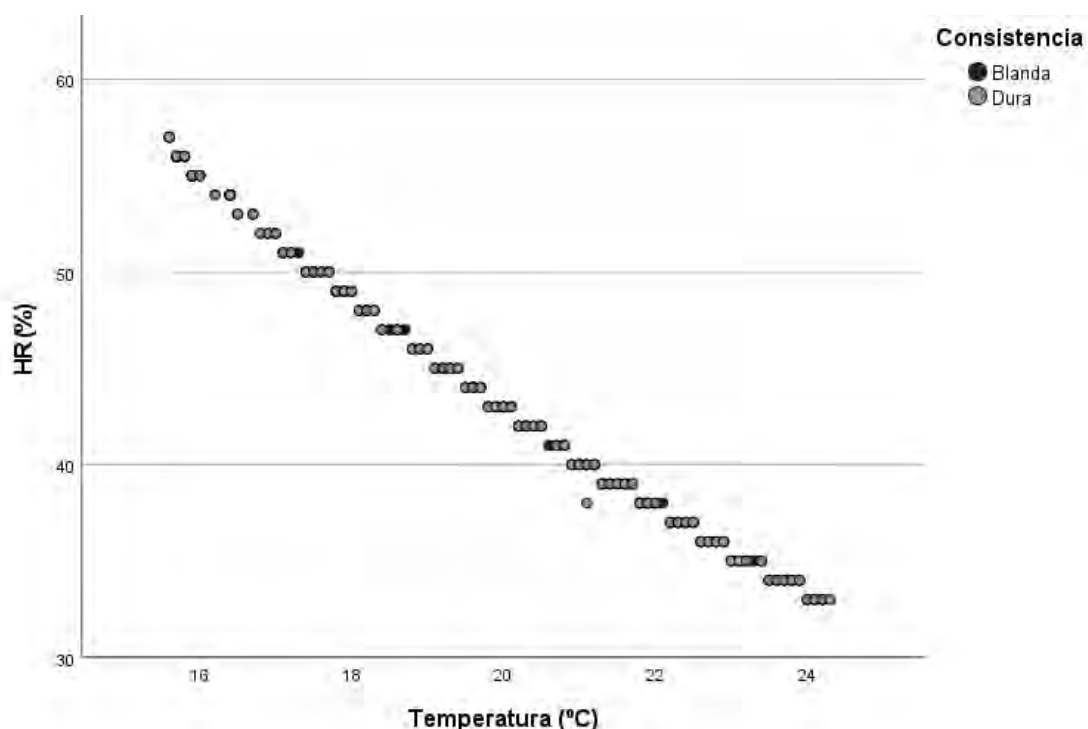


Figura 29. Gráfico de dispersión del registro de T^a y HR medidos durante la realización del ensayo de repeticiones con testigos en condiciones de humedad y T^a variables. HR (%): humedad relativa en porcentaje, T^a ($^{\circ}$ C): temperatura en grados centígrados.

El análisis de correlación entre la T^a y la HR con cada uno de los testigos analizados mostró una relación inversa estadísticamente significativa con un coeficiente de correlación de Pearson de -0.997, de forma que, a mayor T^a menor HR (Tabla 21).

Tabla 21. Análisis estadístico mediante la prueba de correlación de Pearson de las variables T^a y HR en los ensayos de repeticiones con testigos.

Testigo	Coeficiente de correlación de Pearson (p-valor)	
	T^a	HR
Blando	T^a	-0.997(<0.001)*
Duro	T^a	-0.997(<0.001)*

T^a : temperatura, HR: humedad relativa, *: diferencia significativa.

Para cada uno de los dos testigos analizados, la mayoría de las variables mostraron diferencias significativas atendiendo a las condiciones ambientales. En el

caso del testigo asimilable a blando todas las variables analizadas, excepto D10 y la posición máxima, mostraron diferencias significativas (p -valores ≤ 0.037), siendo los rangos promedio a baja T^a y alta HR inferiores a los rangos promedio obtenidos en condiciones de T^a y humedad superiores. En el caso del testigo asimilable a duro, 3 de las variables de desplazamiento (D2 a D4) no mostraron diferencias. Al igual que con el testigo blando, también se registraron rangos promedio inferiores en las condiciones de menor T^a y mayor HR (Tabla 22 y Figura 30).

Tabla 22. Análisis estadístico mediante la prueba de Wilcoxon de suma de rangos para muestras independientes de las variables analizadas en los ensayos de repeticiones con los testigos y condiciones de HR y T^a variables.

Variable	T^a	"Blando"			"Duro"		
		Rango promedio	SR	p-valor	Rango promedio	SR	p-valor
D1	Baja	5.50	55	<0.001*	6.80	68	0.005*
	Alta	15.50	155		14.20	142	
D2	Baja	5.50	55	<0.001*	8.20	82	0.082
	Alta	15.50	155		12.80	128	
D3	Baja	5.50	55	<0.001*	8.40	84	0.112
	Alta	15.50	155		12.60	126	
D4	Baja	6.00	60	<0.001*	8.40	84	0.112
	Alta	15.00	150		12.60	126	
D5	Baja	5.90	59	<0.001*	6.60	66	0.003*
	Alta	15.10	151		14.40	144	
D6	Baja	6.20	62	<0.001*	7.10	71	0.010*
	Alta	14.80	148		13.90	139	
D7	Baja	6.10	61	0.001*	7.00	70	0.008*
	Alta	14.90	149		14.00	140	
D8	Baja	6.00	60	<0.001*	6.80	68	0.005*
	Alta	15.00	150		14.20	142	
D9	Baja	6.50	65	0.002*	7.00	70	0.008*
	Alta	14.50	145		14.00	140	
D10	Baja	8.90	89	0.226	7.00	70	0.008*
	Alta	12.10	121		14.00	140	
Tiempo máximo	Baja	7.75	77	0.037*	7.30	73	0.016*
	Alta	13.25	132		13.70	137	
Posición máxima	Baja	8.80	88	0.199	7.00	70	0.008*
	Alta	12.20	122		14.00	140	

“””: consistencia de los testigos asimilable a, T^a : temperatura, SR: suma de rangos, *: diferencia significativa.

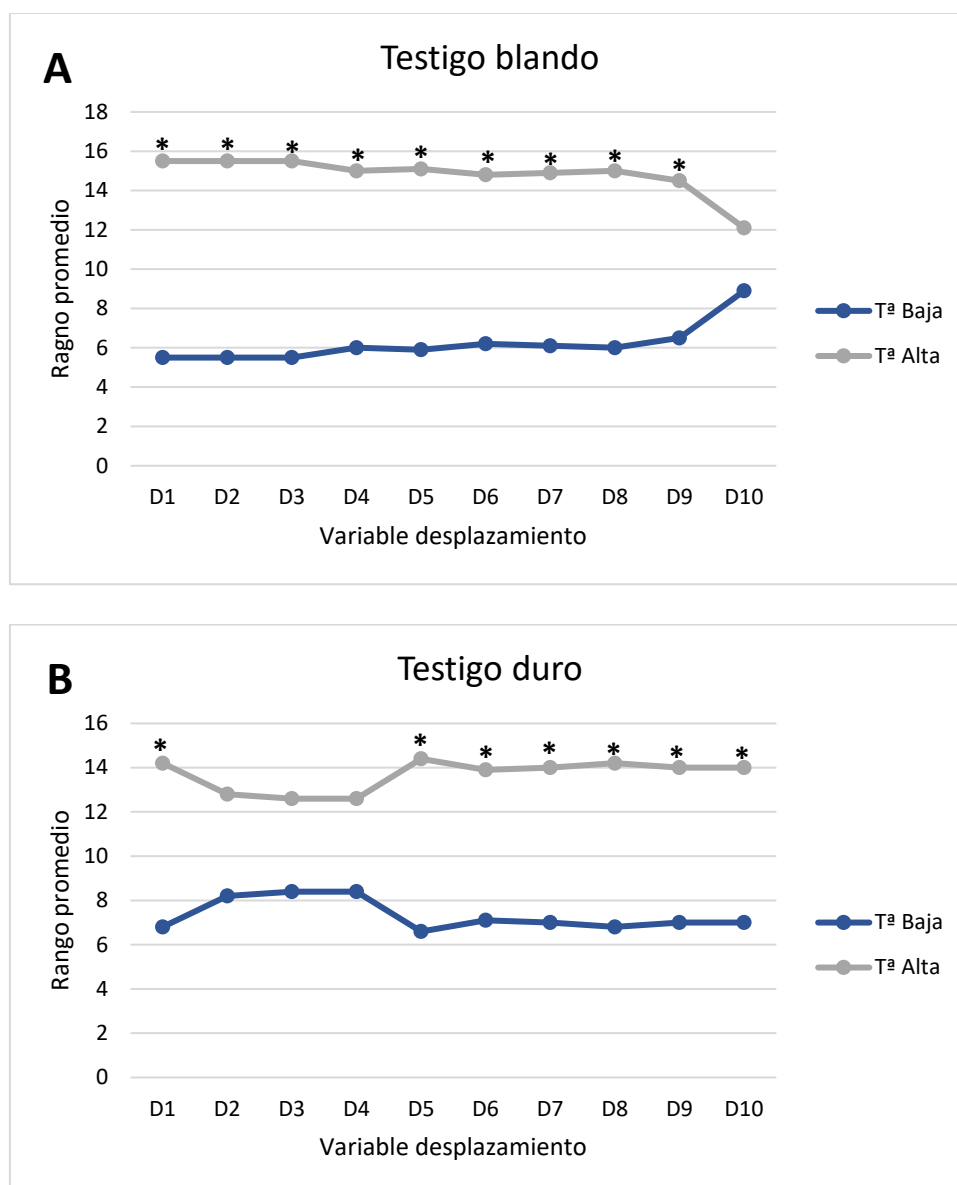


Figura 30. Gráficos de dispersión de los rangos promedio de las variables de desplazamiento (D1 a 10) en función de las condiciones ambientales. A: ensayo de repetición con testigo blando. B: ensayo de repetición con testigo duro, *: diferencia significativa.

DISCUSIÓN

En los ensayos de repeticiones, el MCU determinó más diferencias en función de la consistencia entre los participantes de referencia que entre los testigos inertes, pues un mayor número de variables mostraron diferencias significativas. Posiblemente estas observaciones respondan a que los participantes de referencia, a pesar de pertenecer al mismo género y franja de edad, presentaron mayores diferencias en el comportamiento mecánico de sus láminas ungueales que los testigos inertes empleados. De hecho,

observando las variables de desplazamiento, se puede inferir que en el ensayo con testigos las primeras variables quedarían en la parte lineal del gráfico de tensión-deformación, donde se cumple la Ley de Hooke, y las últimas variables quedarían fuera del límite lineal, mientras que en el ensayo con participantes de referencia todas las variables de desplazamiento, excepto D1, parecen estar dentro de los límites en los que el MCU es sensible a las diferentes consistencias ungueales. También es importante recordar en este punto que los testigos inertes no están especialmente diseñados para el uso que se les ha dado en estos ensayos, aunque si presentan unas propiedades estables de dureza a 21°C y 45% de HR.

Otro aspecto que requiere reflexión es la imposibilidad de detectar con el MCU diferencias entre las uñas de consistencia blanda y dura en los adultos. En un primer momento, se valoró la ausencia de repeticiones en este ensayo como un factor influyente en la falta de sensibilidad del MCU para discriminar las consistencias ungueales. Sin embargo, el ensayo que se realizó con la muestra juvenil puso de manifiesto distintas variables con diferencias significativas, especialmente las que implicaban un mayor desplazamiento, por lo que la falta de sensibilidad en el caso de los adultos no parecía residir, o al menos no de forma primordial, en la reducción de la dispersión de los datos mediante la realización de repeticiones. Además, los resultados obtenidos con los jóvenes difieren de los obtenidos con los participantes de referencia, pues en los primeros los mayores rangos promedio se observaron en las uñas de consistencia blanda mientras que en los segundos, los mayores rangos promedio correspondieron a las uñas de consistencia dura.

En lo relativo a las variables: posición y tiempo máximos y alfa su utilidad a la hora de valorar el comportamiento mecánico de las láminas ungueales ha sido desigual. Así, mientras el tiempo y la posición máxima han mostrado diferencias significativas en los ensayos de repeticiones con los testigos, han sido parcialmente útiles en los ensayos con jóvenes e incapaces de mostrar diferencias con los adultos, por lo que probablemente sea necesario mejorar la funcionalidad del dispositivo antes de poder rechazar la utilidad de estas variables en la determinación de la consistencia ungueal. Por el contrario, y a pesar de que el coeficiente alfa se ha propuesto como una variable con valor descriptivo en el comportamiento mecánico de las láminas ungueales (Traver

et al., 2021), en ninguno de los ensayos realizados ha demostrado ser útil. Posiblemente, parte de la explicación reside en la región del gráfico tensión deformación en la que se encuentran las observaciones. De forma que, para aquellas tensiones en las que la deformación es proporcional, las variables se describan mejor con un modelo lineal que con uno viscoelástico de orden fraccionario, si bien son necesarios más ensayos para poder afirmar esta hipótesis.

A la vista de lo expuesto, consideramos necesario mejorar algunos aspectos y estudiar otros en fases posteriores del desarrollo del MCU con el objetivo de mejorar su capacidad de detección. En primer lugar, resulta crucial incrementar la precisión del MCU, pues la dispersión de las medidas supone una dificultad a la hora de establecer diferencias entre las distintas consistencias ungueales, a pesar de que el análisis de las distribuciones en función de la consistencia sí ha detectado diferencias significativas. En segundo lugar, consideramos necesario analizar el rango de fuerzas más adecuado en el que realizar las mediciones, puesto que se han testado variaciones de fuerza inferiores a 1N, pero no se han analizado fuerzas superiores. Sin embargo, en otro trabajo se han ensayado fuerzas de hasta 6N en láminas ungueales de manos (Perugini *et al.*, 2020). Considerando que el aparato ungueal del pie que es más resistente que el de la mano, cabe suponer que podría soportar fuerzas de deformación superiores a las analizadas, en las que la diferencia entre el comportamiento mecánico de las láminas de consistencia dura y blanda podría ser mayor, especialmente en el caso de los adultos. En tercer lugar y en estrecha relación con las fuerzas a las que se somete la lámina ungueal durante las actividades de la vida diaria se encuentra la curvatura de esta estructura (Sano y Ogawa, 2014), que no se ha valorado en el presente trabajo por ser un análisis preliminar pero que, a la vista de los resultados obtenidos, debería considerarse su influencia en el comportamiento mecánico del modelo con el fin de generar una hipótesis que explique todos los resultados obtenidos. En esta misma línea se encuentra el grosor de la propia lámina cuya influencia en el comportamiento mecánico de la estructura ha sido puesto de manifiesto (Perugini *et al.*, 2020; Mysore *et al.*, 2021), aunque no parece tener influencia sobre la consistencia ungueal tal y como se ha analizado en el capítulo I (Pérez Pico *et al.*, 2017), entendiendo la consistencia como una característica global en la que el comportamiento mecánico de la lámina

ungueal parece tener un papel fundamental. Para finalizar, otro aspecto fundamental que considerar reside en la necesidad de valorar la capacidad de deformación de los tejidos blandos subyacentes al aparato ungueal, como el pulpejo, entre otros. En este sentido, en las láminas ungueales de participantes con mayor edad y, por tanto, más gruesas (Johnson y Shuster, 1994) y potencialmente con mayor resistencia, probablemente la deformación que registró el MCU fuera fundamentalmente debida a la deformación de estos tejidos y no a la de la propia lámina ungueal, mientras que, en los participantes jóvenes con láminas ungueales menos gruesas y más flexibles, la lectura del MCU fuera principalmente debida a la lámina ungueal propiamente dicha y, en menor medida, a la de los tejidos subyacentes. No obstante, en ninguno de los trabajos realizados hasta la fecha se ha valorado la deformación de los tejidos subyacentes al aparato ungueal, sino que se ha analizado el comportamiento mecánico global del extremo distal de los dedos sobre el borde libre de la lámina ungueal (Perugini *et al.*, 2020).

A pesar de las áreas en las que es necesario seguir trabajando para mejorar el dispositivo, se han obtenido resultados destacables que merecen consideración, por ejemplo, dentro de los grupos de jóvenes y adultos, no se detectaron diferencias en función del pie en el que se realizó la medición, lo cual es congruente con que la consistencia ungueal determinada con el método de referencia actual fue la misma en ambos pies para todos los participantes. También se comprobó que, en base a los resultados preliminares obtenidos, no sería necesario variar el rango de fuerzas del MCU en función del género, pues no se han detectado diferencias en el comportamiento mecánico atendiendo a esta característica. Del mismo modo, se demostró la importancia del mantenimiento de las condiciones ambientales de T^a y de HR en la determinación del comportamiento mecánico de los testigos inertes y del dispositivo puesto que, con los ensayos realizados, es imposible discernir si las diferencias observadas fueron debidas a la influencia de las condiciones ambientales sobre los testigos o sobre el propio funcionamiento del MCU.

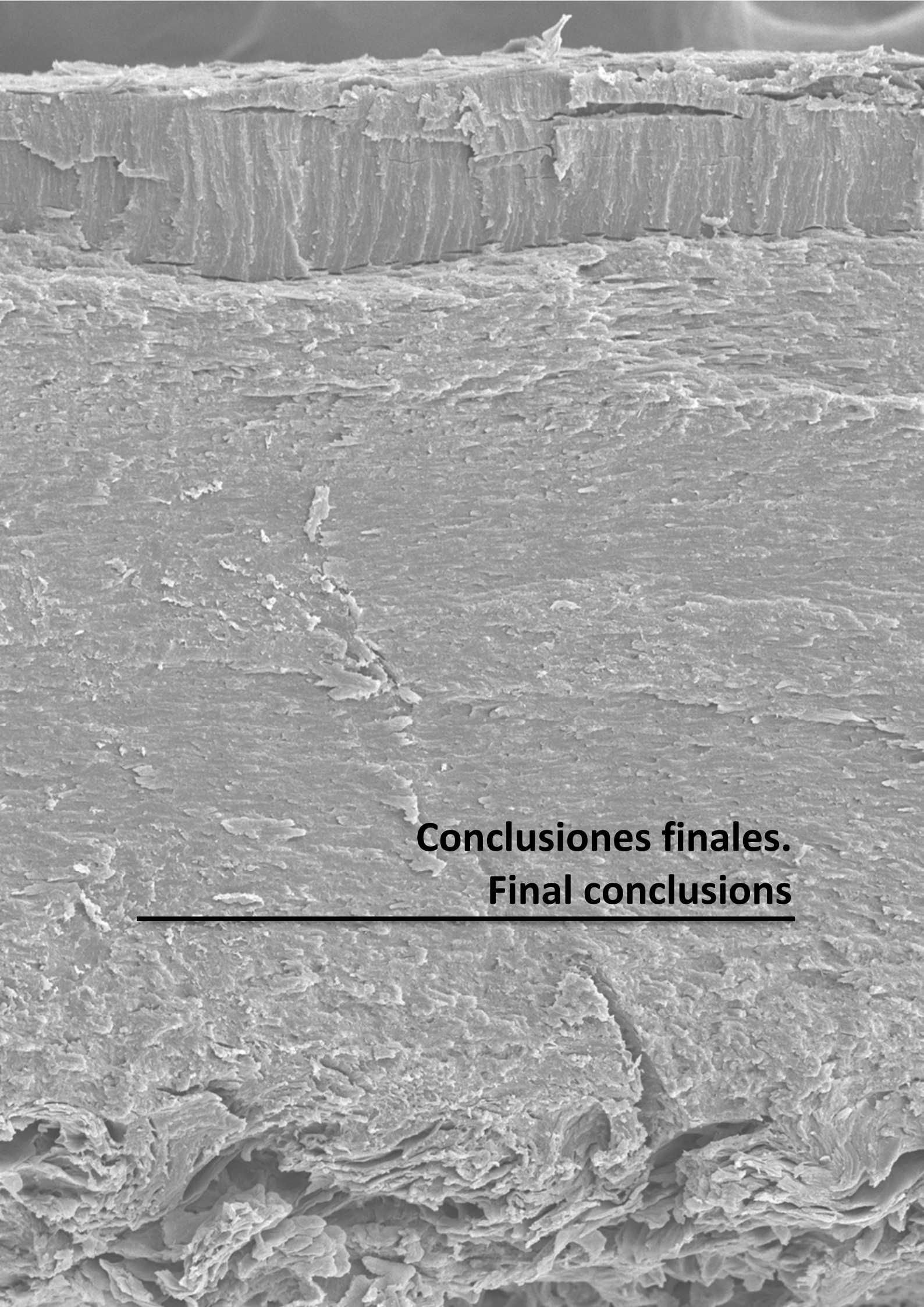
CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un dispositivo MCU capaz de obtener datos cuantitativos del comportamiento mecánico de la lámina ungueal de forma rápida y no invasiva, si bien es necesario implementar algunas mejoras en el dispositivo encaminadas fundamentalmente a incrementar su precisión para poder determinar la consistencia ungueal.
2. El MCU permite detectar diferencias estadísticamente significativas entre los testigos y los participantes de referencia con distinta consistencia ungueal, si bien el hecho de realizar distintas repeticiones de cada medida sea clave en la reducción de la dispersión de las observaciones realizadas.
3. El MCU permite detectar diferencias estadísticamente significativas atendiendo a la consistencia ungueal entre los jóvenes, pero no en los adultos en los que las láminas ungueales tienden a engrosarse y endurecerse con la edad, requiriendo probablemente mayor sensibilidad del MCU para detectar las diferencias de consistencia ungueal en esta población.
4. A la hora de determinar la consistencia ungueal con el MCU, las condiciones ambientales de temperatura y humedad relativa deben ser tenidas en consideración, pues se han detectado diferencias estadísticamente significativas en los ensayos realizados con testigos inertes, si bien no se ha determinado el grado en el que las condiciones ambientales afectan exclusivamente al MCU o los cambios que producen en el comportamiento mecánico de la lámina ungueal.

BIBLIOGRAFÍA

- Ashby, M., Gibson, L., Wegst, U. y Olive, R. (1995). The mechanical properties of natural materials. I. Material property charts. *Proc. R. Soc. Lond. A*(450), 123-140. doi:<https://doi.org/10.1098/rspa.1995.0075>
- Baden, H. P. (1970). The physical properties of nail. *J Invest Dermatol*, 55(2), 115-122. doi:<http://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12291628>
- Baden, H. P., Goldsmith, L. A. y Fleming, B. (1973). A comparative study of the physicochemical properties of human keratinized tissues. *Biochim Biophys Acta*, 322(2), 269-278. doi:[http://doi.org/10.1016/0005-2795\(73\)90303-6](http://doi.org/10.1016/0005-2795(73)90303-6)
- Bonfanti, A., Kaplan, J. L., Charras, G. y Kabla, A. (2020). Fractional viscoelastic models for power-law materials. *Soft Matter*, 16(26), 6002-6020. doi:<https://doi.org/10.1039/D0SM00354A>
- Chou, C. C. y Buehler, M. J. (2012). Structure and mechanical properties of human trichocyte keratin intermediate filament protein. *Biomacromolecules*, 13(11), 3522-3532. doi:<http://doi.org/10.1021/bm301254u>
- de Berker, D., Mawhinney, B. y Sviland, L. (1996). Quantification of regional matrix nail production. *Br J Dermatol*, 134(6), 1083-1086. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1996.d01-906.x>
- Farran, L., Ennos, A. R. y Eichhorn, S. J. (2008). The effect of humidity on the fracture properties of human fingernails. *J Exp Biol*, 211(Pt 23), 3677-3681. doi:<http://doi.org/10.1242/jeb.023218>
- Farran, L., Ennos, A. R., Starkie, M. y Eichhorn, S. J. (2009). Tensile and shear properties of fingernails as a function of a changing humidity environment. *J Biomech*, 42(9), 1230-1235. doi:10.1016/j.jbiomech.2009.03.020
- Farren, L., Shayler, S. y Ennos, A. R. (2004). The fracture properties and mechanical design of human fingernails. *J Exp Biol*, 207(Pt 5), 735-741. doi:<https://doi.org/10.1242/jeb.00814>
- Finlay, A. Y., Frost, P., Keith, A. D. y Snipes, W. (1980). An assessment of factors influencing flexibility of human fingernails. *Br J Dermatol*, 103(4), 357-365. doi:<http://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1980.tb07257.x>
- Forslind, B., Nordstrom, G., Toijer, D. y Eriksson, K. (1980). The rigidity of human fingernails: a biophysical investigation on influencing physical parameters. *Acta Derm Venereol*, 60(3), 217-222. doi:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6158223/>
- Forslind, B. y Thyresson, N. (1975). On the structure of the normal nail. A scanning electron microscope study. *Arch Dermatol Forsch*, 251(3), 199-204. doi:<http://doi.org/10.1007/BF00561761>
- Fraser, R. D. y Macrae, T. P. (1980). Molecular structure and mechanical properties of keratins. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 34, 211-246.
- Jachowicz, J. y McMullen, R. (2002). Mechanical analysis of elasticity and flexibility of virgin and polymer-treated hair fiber assemblies. *J Cosmet Sci*, 53(6), 345-361.
- Johnson, M. y Shuster, S. (1994). Determinants of nail thickness and length. *Br J Dermatol*, 130(2), 195-198. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1994.tb02899.x>
- Knoop, F., Peters, C. G. y Emerson, W. B. (1939). A sensitive pyramidal-diamond tool for indentation measurements. *J. Res. Natl. Bur. Stand.*, 23(1), 39-61. doi:<https://doi.org/10.6028/jres.023.022>
- Kobayachi, Y., Miyamoto, M., Sugibayashi, K. y Morimoto, Y. (1999). Drug Permeation through the Three Layers of the Human Nail Plate. *J Pharm Pharmacol*, 51(3), 271-278. doi:<https://doi.org/10.1211/0022357991772448>
- Langford, D. T., Burke, C. y Robertson, K. (1989). Risk factors in onychocryptosis. *Br J Surg*, 76(1), 45-48. doi:<https://doi.org/10.1002/bjs.1800760114>

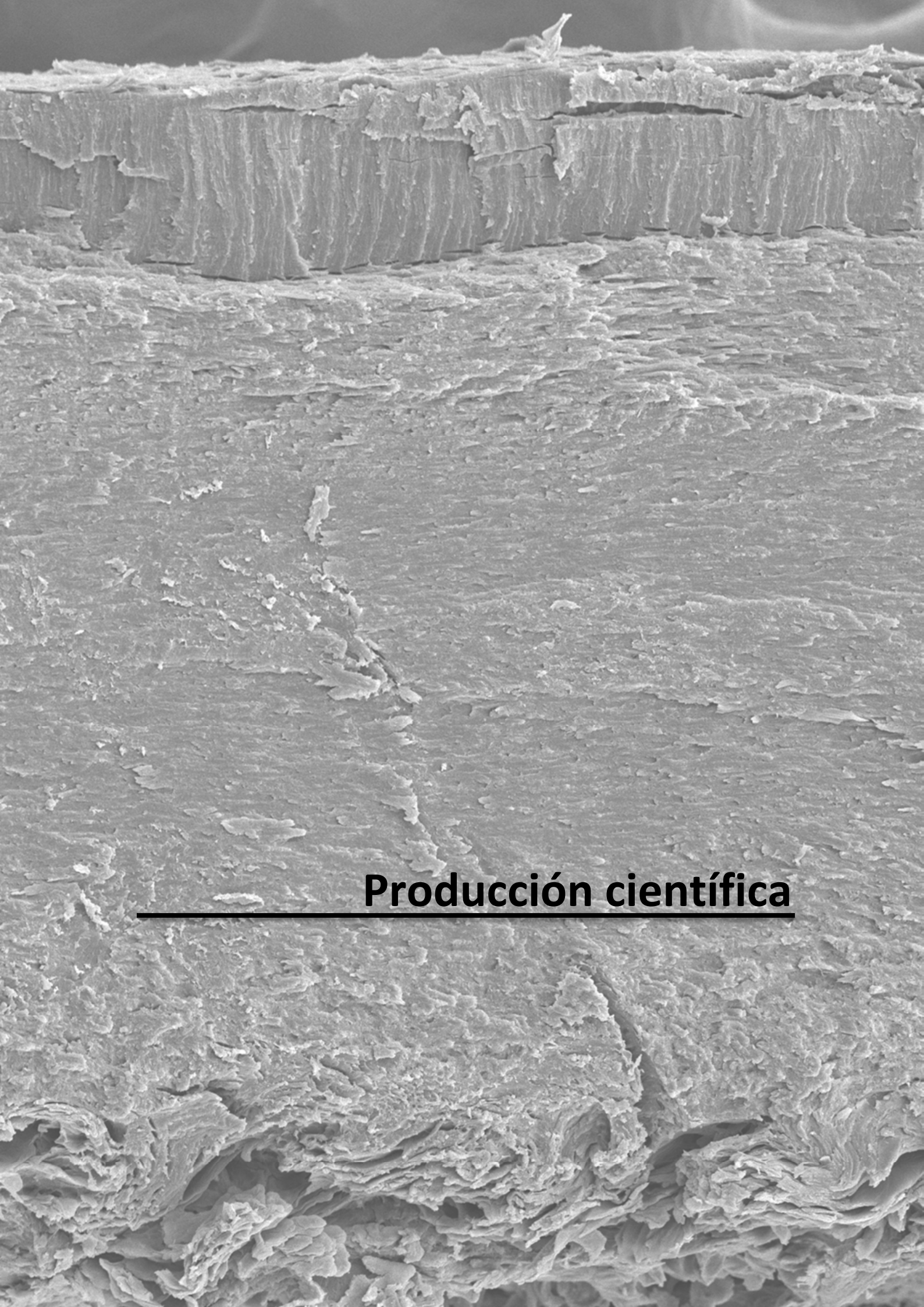
- Maloney, N. J. y Paquette, E. G.** (1977). The physical properties of fingernails I. Apparatus for physical measurement. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 28, 415-425.
- Mysore, T. H. M., Patil, A. Y., Raju, G. U., Banapurmath, N. R., Bhovi, P. M., Afzal, A., Alamri, S. y Saleel, C. A.** (2021). Investigation of mechanical and physical properties of big sheep horn as an alternative biomaterial for structural applications. *Materials (Basel)*, 14(14).doi: <https://doi.org/10.3390/ma14144039>
- Newman, S. B. y Young, R. W.** (1967). Indentation hardness of the fingernail. *J Invest Dermatol*, 49(1), 103-105. doi:<http://doi.org/10.1038/jid.1967.110>
- Pérez Pico, A. M., Verjano, E. y Mayordomo, R.** (2017). Relation between nail consistency and incidence of ingrown toenails in young male runners. *J Am Podiatr Med Assoc*, 107(2), 137-143. doi:<https://doi.org/10.7547/15-121>
- Perugini, P., Sacchi, S. y Musitelli, G.** (2020). Nail StrainStress Meter NM 100: A novel in vivo method to characterize biomechanical properties of nails. *Skin Res Technol*, 26(3), 422-430.doi: <https://doi.org/10.1111/srt.12818>
- Ritchie, R. O., Koester, K. J., Ionova, S., Yao, W., Lane, N. E. y Ager, J. W., 3rd.** (2008). Measurement of the toughness of bone: a tutorial with special reference to small animal studies. *Bone*, 43(5), 798-812. doi:<http://doi.org/10.1016/j.bone.2008.04.027>
- Rodas Durán, J. E.** (2003). *Biofísica fundamentos e aplicações*. São Paulo: Prentice Hall.
- Sano, H. y Ogawa, R.** (2014). Clinical evidence for the relationship between nail configuration and mechanical forces. *Plast Reconstr Surg Glob Open*, 2(3), e115. doi:<https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000000057>
- Tipler, P. A. y Mosca, G.** (2010). *Física para la ciencia y la tecnología I* (6 TH ed. Vol. 1A): Editorial Reverté.
- Traver, J. E., Tejado, I., Mingorance, E., Prieto-Arranz, J., Mayordomo, R., Perez-Pico, A. M. y Vinagre, B. M.** (2021). Fractional modeling of flexural behavior of toenail plates: First step for clinical purposes. *Med Eng Phys*, 90, 23-32. doi:<https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2021.01.006>
- Young, R. W., Newman, S. B. y Capott, R. J.** (1965). Strength of Fingernails. *J Invest Dermatol*, 44, 358-360. doi:<https://doi.org/10.1038/jid.1965.64>
- Zhao, L., Lee, T., Ryu, S., Oshima, Y., Guo, Q. y Zhang, D.** (2021). Mechanical Robustness of Metal Nanocomposites Rendered by Graphene Functionalization. *Nano Lett*, 21(13), 5706-5713. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.1c01438>



Conclusiones finales.
Final conclusions

1. La consistencia ungueal se relaciona con la composición de tres elementos químicos: calcio, magnesio y potasio en determinadas capas. Así, las uñas de consistencia dura tienen más calcio en la capa dorsal, menos magnesio en la capa intermedia y menos potasio en la capa ventral. Estas diferencias permiten el desarrollo de un modelo matemático predictivo de la consistencia ungueal con niveles de acierto superiores al 75%.
2. El diseño de un protocolo específico, previo al seccionado, basado en el empleo de un agente reductor como es el 2-mercaptoetanol, facilita el manejo histológico de las muestras altamente queratinizadas. Este hallazgo supone un avance en el procesamiento de este tipo de tejidos.
3. La consistencia ungueal se relaciona con la presencia de la queratina epitelial K17, de forma que las uñas de consistencia dura tienen mayor contenido en esta queratina que las uñas de consistencia blanda.
4. Se ha desarrollado y patentado un dispositivo capaz de obtener datos cuantitativos del comportamiento mecánico de la lámina ungueal de forma rápida y no invasiva, que requiere del control de las condiciones ambientales durante su uso. El dispositivo detecta diferencias en función de la consistencia ungueal, pero requiere implementar mejoras para incrementar su precisión y sensibilidad.
5. La consistencia ungueal es una característica medible de las láminas ungueales que está determinada a nivel molecular y elemental, y que se relaciona con su comportamiento mecánico. El análisis de este comportamiento sugiere que es posible determinar la consistencia objetivamente mediante un dispositivo, lo que facilitaría la valoración de la consistencia ungueal por parte de los profesionales de la salud en general y de los podólogos en particular durante las exploraciones clínicas podológicas.

1. Nail consistency is associated with the composition of three chemical elements - calcium, magnesium and potassium - in specific layers. Hard consistency nails have more calcium in the dorsal layer, less magnesium in the intermediate layer and less potassium in the ventral layer. These differences can be used to develop a predictive mathematical model of nail consistency that achieves accuracy levels higher than 75%.
2. Designing a specific pre-sectioning protocol based on the use of a reducing agent (2-mercaptoethanol) facilitates histological handling of highly keratinised samples. This finding constitutes an advance in the processing of this type of tissue.
3. Nail consistency is associated with the presence of epithelial keratin K17, as hard consistency nails have a higher content of this keratin than soft consistency nails.
4. We developed and patented a device that rapidly and non-invasively obtains quantitative data about the mechanical behaviour of the nail plate and requires control of ambient conditions during use. The device detects differences in nail consistency, but improvements are needed to increase its accuracy and sensitivity.
5. Nail consistency is a measurable characteristic of the nail plate that is determined at molecular and elemental level and is associated with the mechanical behaviour of the nail plate. Analysis of this behaviour suggests that consistency can be determined objectively using a device, facilitating the assessment of nail consistency by health professionals in general, and podiatrists in particular, during clinical examination of the foot.



Producción científica

Artículos científicos

1. **Mingorance Álvarez, E.**, Martínez Quintana, R., Pérez Pico, A.M., Mayordomo, R., 2021. Predictive Model of Nail Consistency Using Scanning Electron Microscopy with Energy-Dispersive X-Ray. *Biology* (Basel). 10. <http://doi.org/10.3390/biology10010053>.
2. Traver, J.E., Tejado, I., **Mingorance, E.**, Prieto-Arranz, J., Mayordomo, R., Perez-Pico, A.M., Vinagre, B.M., 2021. Fractional modeling of flexural behavior of toenail plates: First step for clinical purposes. *Med Eng Phys.* 90, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2021.01.006>.
3. **Mingorance Álvarez, E.**, Rodríguez-León, J., Pérez Pico, A.M., Mayordomo, R., 2022. Comparative Analysis of Type I Keratin Expression By Nail Consistency: An Immunohistochemistry Study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 30, 298-303. <http://doi.org/10.1097/pai.0000000000001011>.
4. **Mingorance Álvarez, E.**, Martínez Quintana, R., Pérez Pico, A.M., Mayordomo, R. Determining nail consistency by quantification of type I Keratins (Has been accepted for publication in the *European Journal of Anatomy*. It will appear in Volume 26, Number 6, November, 2022).

Patente

1. Título: dispositivo para la determinación de la consistencia ungueal. Inventores: Mayordomo Acevedo, Raquel; **Mingorance Álvarez, Ester**; Pérez Pico, Ana María; Tejado Balsera, Inés; Traver Becerra, José Emilio; Vinagre Jara, Blas Manuel; Prieto Arranz, Javier Y Feliu Batlle, Vicente (Anexo III).

Madrid, July 20th, 2022

TO WHON IT MY CONCERN

CERTIFY

The original article entitled:

DETERMINING NAIL CONSISTENCY BY QUANTIFICATION OF TYPE I KERATINS

Esther Mingorance Álvarez¹, Rodrigo Martínez Quintana², Ana M^a Pérez Pico³ and Raquel Mayordomo^{1,*}

¹ Department of Anatomy and Cell Biology, University Center of Plasencia, University of Extremadura, Avda. Virgen del Puerto 2. 10600 Plasencia, Cáceres, Spain. emingorance@unex.es; rmayordo@unex.es

² Department of Mathematics, University Center of Plasencia, University of Extremadura, Avda. Virgen del Puerto 2. 10600 Plasencia, Cáceres, Spain. rmartinez@unex.es

³ Department of Nursing, University Center of Plasencia, University of Extremadura, Avda. Virgen del Puerto 2. 10600 Plasencia, Cáceres, Spain. aperpic@unex.es

* Correspondence: rmayordo@unex.es Tel: +34636526498; Fax: +34927425209

HAS BEEN ACCEPTED FOR PUBLICATION IN THE EUROPEAN JOURNAL OF ANATOMY. It will appear in Volume 26, Number 6, November, 2022.

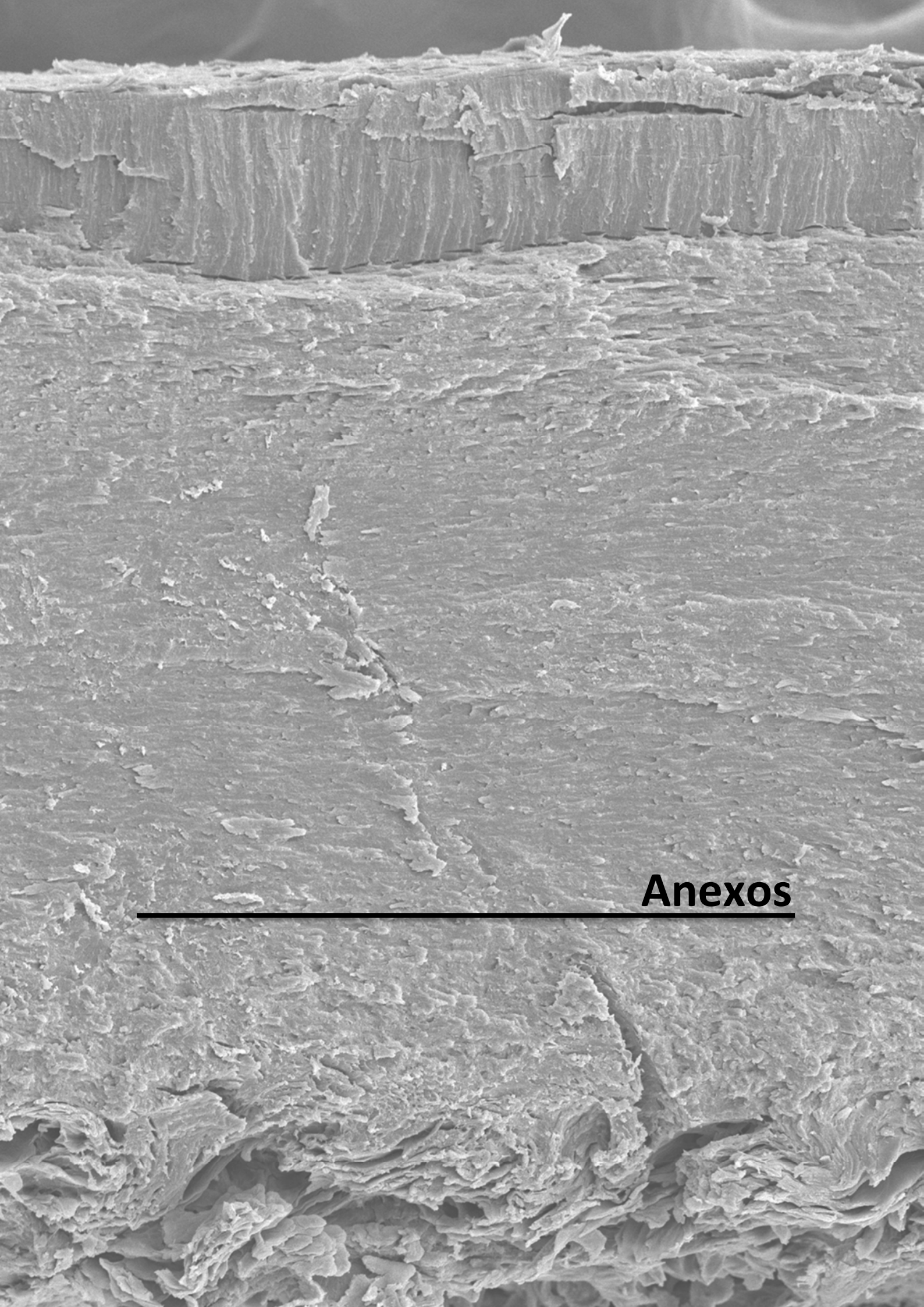
And me, as Editor-In-Chief of the Journal, giving up the copyright of the above-mentioned article to the authors.



Jose Sanudo

Editor-In-Chief

<https://eurjanat.com>



Anexos



**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN,
TRANSFERENCIA E INNOVACIÓN**

Campus Universitario
Avda de Elvas s/nº
06071 BADAJOZ

Tel.: 924 28 93 05
Fax: 924 27 29 83

NºRegistro: 116/2016

**Dª Mª ANGELES TORMO GARCIA, SECRETARIA DE LA COMISION DE
BIOÉTICA Y BIOSEGURIDAD DE LA UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA.**

INFORMA: Que una vez analizada, por esta Comisión la solicitud de Proyecto de Proyecto de Investigación titulado “Consistencia ungueal: estudio, caracterización y consideración de su inclusión como factor de riesgo en le desarrollo de patologías ungueales“, cuyo Investigador Principal es D/Dª Ester Mingorance Alvarez, ha decidido por unanimidad valorar positivamente el proyecto por considerar que se ajusta a las normas éticas y de Bioseguridad esenciales cumpliendo con la normativa vigente al efecto.

Y para que conste y surta los efectos oportunos firmo el presente informe en Badajoz a 10 de noviembre de 2016



VºBº

Fdo.: Fernando Henao Dávila
Presidente por Delegación de Comisión
de Bioética y Bioseguridad

Anexo II

REFERENCIA: FECHA RECOGIDA: EDAD: FECHA NAC.: SEXO:

ESTADO: PREMENARQUIA/MENARQUIA/MENOPAUSIA. EMBARAZO ACTUAL: SI/NO. Nº DE HIJOS:

PESO: ALTURA: IMC:

% HR SALA: Tª SALA: ¿FECHA ÚLTIMO TTO. UNGUEAL?

			PD				PI			
	PD	PI	1º DEDO		4º DEDO		1º DEDO		4º DEDO	
CONSISTENCIA										
GROSOR										
% HUMEDAD UÑA										
% GRASA UÑA										
% HUMEDAD PIEL										
% GRASA PIEL										
ENFERMEDAD DIAGNOS.	sí/no		DIGA CUÁL							
MALNUTRICIÓN										
DÉFICIT DE ATOS/AA/VITAM										
TIPO DE DIETA QUE SIGUE										
ANEMIA										
HIPOALBUMINEMIA										
PROBLEMAS RENALES										
CARDIOPATÍAS										
PROBLEMAS CIRCULATORIOS										
PROBLEMAS HEPÁTICOS										
HIPOTIROIDISMO										
HIPERTIROIDISMO										
OTROS PROBLEMAS HORM.										
DIABETES										
CÁNCER										
TUBERCULOSIS										
PROBLEMAS RESPIRATORIOS										
LUPUS ERITEMATOSO SIST.										
ARTRITIS REUMATOIDE										
OTRAS ENFERMEDADES										

	sí/no	¿EN QUÉ DEDO?	
TIPO DE PIEL: SECA/MEDIA/GRASA			
ECCEMA UNGUEAL			
PSORIASIS/PSORIASIS UNGUEAL			
ONICOMICOSIS			
ONICOLISIS			
ONICOGRIFOSIS			
ONICOCRIPTOSIS			
ONICODISTROFIA			
OTROS			
	sí/no	DIGA CUÁL	HORAS SEMANALES
¿PRACTICA DEPORTE?			
TIPO DE CALZADO EN EL DEPORTE		SINTÉTICO/NATURAL/PLANO/TACÓN	
¿CAMINA?			
TIPO DE CALZADO CUANDO CAMINA		SINTÉTICO/NATURAL/PLANO/TACÓN	

	DIGA CUÁL/ES
MEDICAMENTO QUE TOMA_1	
VÍA DE ADMINISTRACIÓN_1	
DOSIFICACIÓN/POSOLOGÍA_1	
FECHA DE INICIO DEL TRATAMIENTO_1	
FECHA FIN DE TRATAMIENTO_1	
MEDICAMENTO QUE TOMA_2	
VÍA DE ADMINISTRACIÓN_2	
DOSIFICACIÓN/POSOLOGÍA_2	
FECHA DE INICIO DEL TRATAMIENTO_2	
FECHA FIN DE TRATAMIENTO_2	
MEDICAMENTO QUE TOMA_3	
VÍA DE ADMINISTRACIÓN_3	
DOSIFICACIÓN/POSOLOGÍA_3	
FECHA DE INICIO DEL TRATAMIENTO_3	
FECHA FIN DE TRATAMIENTO_3	
MEDICAMENTO QUE TOMA_4	
VÍA DE ADMINISTRACIÓN_4	
DOSIFICACIÓN/POSOLOGÍA_4	
FECHA DE INICIO DEL TRATAMIENTO_4	
FECHA FIN DE TRATAMIENTO_4	
MEDICAMENTO QUE TOMA_5	
VÍA DE ADMINISTRACIÓN_5	
DOSIFICACIÓN/POSOLOGÍA_5	
FECHA DE INICIO DEL TRATAMIENTO_5	
FECHA FIN DE TRATAMIENTO_5	
MEDICAMENTO QUE TOMA_6	
VÍA DE ADMINISTRACIÓN_6	
DOSIFICACIÓN/POSOLOGÍA_6	
FECHA DE INICIO DEL TRATAMIENTO_6	
FECHA FIN DE TRATAMIENTO_6	
MEDICAMENTO QUE TOMA_7	
VÍA DE ADMINISTRACIÓN_7	
DOSIFICACIÓN/POSOLOGÍA_7	
FECHA DE INICIO DEL TRATAMIENTO_7	
FECHA FIN DE TRATAMIENTO_7	
MEDICAMENTO QUE TOMA_8	
VÍA DE ADMINISTRACIÓN_8	
DOSIFICACIÓN/POSOLOGÍA_8	
FECHA DE INICIO DEL TRATAMIENTO_8	
FECHA FIN DE TRATAMIENTO_8	
OTROS	



① Número de publicación: **2 784 799**

② Número de solicitud: 201930273

⑤ Int. Cl.:

A61B 5/103 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

⑫ Fecha de presentación:

26.03.2019

⑬ Fecha de publicación de la solicitud:

30.09.2020

Fecha de concesión:

09.04.2021

⑭ Fecha de publicación de la concesión:

16.04.2021

⑰ Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA (81.0%)
Campus Universitario Avda. de Elvas, s/n
06071 Badajoz (Badajoz) ES y
UNIVERSIDAD DE CASTILLA LA MANCHA
(19.0%)**

⑱ Inventor/es:

**MAYORDOMO ACEVEDO, Raquel;
MINGORANCE ÁLVAREZ, Ester;
PÉREZ PICO, Ana Maria;
TEJADO BALSERA, Inés;
TRAVER BECERRA, José Emilio;
VINAGRE JARA, Blas Manuel;
PRIETO ARRANZ, Javier y
FELIU BATLLE, Vicente**

⑳ Agente/Representante:

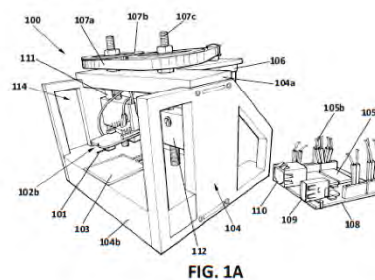
GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

⑳ Título: **Dispositivo para la determinación de la consistencia ungueal**

㉑ Resumen:

Dispositivo para la determinación de la consistencia ungueal.

Dispositivo para la obtención de medidas para la determinación de la consistencia de una lámina ungueal de una uña de un usuario "in vivo". La lámina ungueal comprende un borde libre y está asociada a un lecho ungueal, caracterizado porque el dispositivo comprende un mecanismo de presión adaptado para aplicar fuerza puntual sobre el borde libre de la lámina ungueal y medir un valor de fuerza que causa la flexión del borde libre de la lámina ungueal y medios de captación ópticos configurados para captar la curvatura de la uña antes de aplicar fuerza puntual sobre el borde libre de la lámina ungueal, medir el grosor de la lámina ungueal, y captar el cambio de coloración del lecho ungueal causado por la flexión del borde libre de la lámina ungueal.



ES 2 784 799 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 784 799 B2

DESCRIPCIÓN

Dispositivo para la determinación de la consistencia ungueal

- 5 Dispositivo para la obtención de medidas para la determinación de la consistencia ungueal.

Objeto de la invención

- 10 La presente invención pertenece al campo de equipos de estudio y diagnóstico usados en la rama de la podología.

- 15 El objeto de la presente invención es proporcionar un dispositivo para la obtención de medidas objetivas de las características propias de la lámina ungueal de usuarios "in vivo", así como el método matemático de valoración de las mismas, para determinar la consistencia ungueal. Estas medidas son: la flexión del borde libre de la lámina ungueal, el grosor de la lámina ungueal, la curvatura de la uña, la compresión del dedo y el cambio de coloración del lecho ungueal.

Antecedentes de la invención

- 20 La lámina ungueal, comúnmente conocida como uña, es la parte translúcida del aparato ungueal. Está compuesta por un lecho ungueal de queratina dura, plana en sentido longitudinal, convexa en sus bordes y ligeramente curvada en su extremo. Protege las estructuras del dedo (falanges distales, estructuras sensitivas y tejidos blandos) de presiones anómalas. También participa en la biomecánica digital formando una capa dura, como si fuera un escudo, sobre el tejido adiposo del pulpejo del dedo y de la falange distal.
- 25 De esta manera, cuando damos un paso y apoyamos los dedos en el suelo, los tejidos blandos tienden a desplazarse hacia arriba por la fuerza de reacción del suelo y, al encontrarse con la resistencia de la lámina ungueal, la superficie de contacto aumenta, por lo que el reparto de las presiones en el pulpejo del dedo es más equilibrado.
- 30

- Muchas enfermedades sistémicas, tales como hipotiroidismo, hipertiroidismo, alteraciones del tejido conectivo, enfermedades broncopulmonares, cardiovasculares, psoriasis, alteraciones renales, etc. pueden producir alteraciones de las características de las uñas.
- 35 Son muchos, por tanto, los factores que pueden originar alteraciones de las uñas, que se pueden clasificar en lesiones de origen traumático y no traumático. Asimismo, alrededor del

ES 2 784 799 B2

10% de la población sufre patologías por infecciones fúngicas, que representan el 50% de las patologías que afectan a las uñas. La práctica deportiva puede incrementar la aparición de alteraciones como fractura laminar, hemorragias astilladas, onicocriptosis o, incluso, la pérdida de la uña. Estas lesiones no sólo afectan a nivel físico, sino que también inciden a nivel emocional y social en las personas que las padecen.

La onicomicosis es la infección de las uñas por hongos patógenos. Es una de las patologías más frecuentes en la población y produce cambios de coloración y debilidad de las uñas al ser degradadas por el patógeno. El tratamiento suele consistir en antifúngicos. Por su parte, la onicocriptosis es una patología dolorosa en la que los bordes laterales y/o distales de la uña penetran en el tejido blando periungueal. Suele producirse por microtraumatismos mecánicos causados durante la actividad cotidiana y deportiva, y/o por el uso de calzado inadecuado. Recientes estudios han establecido diferentes consistencias ungueales en la población. Además, han puesto en evidencia la relación entre factores intrínsecos (propios de cada individuo, como el sexo, la forma y la consistencia de las uñas) y la aparición de onicocriptosis. Sin embargo, no existen en la literatura herramientas metodológicas que determinen la consistencia ungueal de forma objetiva, cuantitativa ni reproducible, y que permitan la realización de trabajos de investigación que analicen su relación con otros factores intrínsecos y extrínsecos.

Así pues, se hace necesario el desarrollo de una herramienta para la obtención de medidas que determinen el estado y salud de las uñas. Una herramienta asequible para los profesionales de la salud, y en especial a los podólogos, que les permita actuar a nivel preventivo, detectando variaciones en las características propias de la lámina ungueal de cada individuo. También sería útil para la realización de exploraciones más completas y en el diagnóstico y seguimiento objetivo de los tratamientos prescritos.

Descripción de la invención

En general, la máxima de los profesionales sanitarios es inculcar la prevención primaria. A este nivel, en el ámbito podológico el dispositivo de la presente invención podrá realizar mediciones iniciales que determinen la consistencia ungueal propia del paciente en ausencia de alteraciones. A nivel de prevención secundaria, permitirá la detección precoz de alteraciones, al cuantificar cambios morfológicos o de la consistencia que se desvían de la línea de base para el estado de salud de cada individuo. En este sentido, se podrán establecer actuaciones preventivas antes de que aparezca la sintomatología típica de la

ES 2 784 799 B2

enfermedad sistémica o alteración ungueal. En otros casos, el dispositivo podrá utilizarse para monitorizar la evolución del tratamiento prescrito.

Un ejemplo concreto es su aplicación en el tratamiento de la onicocriptosis, que consiste en la corrección de la morfología de la uña mediante el restablecimiento de su correcto desarrollo y/o forma. El primer nivel de actuación y, dependiendo de la gravedad del caso, consiste en la reeducación de la lámina ungueal mediante métodos no invasivos (ortonixias). El objetivo es corregir el crecimiento de la lámina ungueal desde su origen en la matriz ungueal. La presente invención facilitará la toma de decisiones a la hora de establecer la técnica de reeducación más adecuada para cada individuo atendiendo a sus propias características y consistencia ungueal (braquet, botones, sistemas de fijación, etc.). Además, permitirá monitorizar el grado de corrección de uña a lo largo del tratamiento y frenará la progresión de la alteración y sus posibles complicaciones. Esta progresión suele requerir de medidas invasivas, previsiblemente cirugía, con el coste económico que ello conlleva.

Las técnicas de reeducación ungueal son incruentas y, por tanto, están bien consideradas por los pacientes. Sin embargo, al ser tratamientos que se dilatan en el tiempo, los pacientes muestran poca adhesión. El uso de la presente invención permitirá reducir el tiempo de tratamiento, pues aportará información vital para la elección de la técnica más adecuada para cada paciente. Además, la monitorización objetiva de los progresos realizados motivará a los pacientes para continuar con el tratamiento y dotará al profesional de la información necesaria para modificar la técnica empleada, en caso de ser necesario.

La consistencia ungueal es resultado de la relación de diferentes variables medidas en la lámina ungueal: la flexión del borde libre de la lámina ungueal, el grosor de la lámina ungueal, la curvatura de la uña, la compresión del dedo y el cambio de coloración del lecho ungueal.

La medida de la flexión del borde libre de la lámina ungueal aporta información sobre la capacidad que tiene la lámina para deformarse y recuperar su posición de partida. De la flexibilidad de esta lámina depende su adaptabilidad a los tejidos del dedo y la vascularización de los mismos. El grosor de la lámina ungueal indica el espesor de queratinocitos que la conforman y la presión que puede ejercer sobre los tejidos de los dedos. La medida de la curvatura de la uña indica su disposición sobre el dedo y está relacionada con la probabilidad de padecer onicocriptosis. La compresión del dedo permite

ES 2 784 799 B2

la estandarización de la posición de medición en el dispositivo. La medida del cambio de coloración que se produce en el lecho ungueal cuando la uña presiona sobre los tejidos del dedo puede ser útil para valorar el flujo distal, ya que permite calcular el tiempo de relleno capilar. Esta medida se realiza aplicando presión sobre la uña hasta que el lecho se vuelve
5 blanco. Esta palidez indica el cese del riego sanguíneo al tejido. Una vez se detiene la presión, la sangre irriga de nuevo el tejido y el lecho se torna rosado. Aunque la valoración del flujo sanguíneo distal se puede realizar aplicando presión con la mano, el ojo humano no interpreta de igual manera los colores, por lo que puede haber diferencias en la apreciación del mismo entre profesionales. Esta medición es de vital importancia a la hora de valorar
10 pacientes de riesgo, especialmente en el caso de pie diabético. Todas las mediciones proporcionadas por el dispositivo de manera objetiva, cuantitativa y reproducible, evitan posibles diferencias interpretativas entre profesionales: médicos, enfermeros y podólogos.

Por todo ello, las medidas que se obtienen con el dispositivo, de acuerdo con la presente
15 invención, deben realizarse en combinación con la realización de una exploración adecuada, antes y durante el seguimiento de cualquier tratamiento establecido, ya sea conservador o quirúrgico. De esta manera, se realizará un diagnóstico más efectivo, se planificará la actuación terapéutica más adecuada y se podrá realizar un seguimiento objetivo de la eficacia del tratamiento prescrito a lo largo del tiempo.

20

Descripción de los dibujos

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento, de acuerdo con un ejemplo preferente
25 de realización práctica del mismo, se acompaña como parte integrante de dicha descripción un juego de dibujos en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

La figuras 1A, 1B y 1C muestran diferentes vistas de una realización de un dispositivo para
30 la obtención de medidas para la determinación de la consistencia ungueal de acuerdo con la presente invención y una uña de un pie de un usuario "in vivo".

La figura 2 muestra un diagrama de bloques del sistema electrónico de control del dispositivo de acuerdo con la presente invención.

Las figuras 3A y 3B muestran un ensayo de comprensión con una uña.

35 La figura 4 muestra un esquema de deflexión del mecanismo de presión que corresponde a una célula de carga.

ES 2 784 799 B2

Las figuras 5A a 5D muestran diferentes ensayos para la caracterización de una célula de carga.

La figura 6 muestra un diagrama de flujo de eventos del funcionamiento del dispositivo para la obtención de medidas para la determinación de la consistencia ungueal.

- 5 La figura 7 muestra un perfil de velocidad de desplazamiento de una célula de carga.
La figura 8 muestra una máquina de estados del protocolo de ensayo.
La figura 9 muestra una interfaz hombre-máquina (HMI).

Realización preferente de la invención

10

Las figuras 1A, 1B y 1C muestran diferentes vistas de una realización de un dispositivo (100) para la obtención de medidas para la determinación de la consistencia de una lámina ungueal (120) de una uña de un usuario "in vivo" de acuerdo con la presente invención.

- 15 El dispositivo (100) cuenta con los siguientes elementos mecánicos: un motor paso a paso (106) como actuador para la generación del movimiento que será transmitido mediante una correa (107a) a dos engranajes (107b) que transforman el movimiento angular en transversal mediante dos tornillos sin fin (107c), que permiten el desplazamiento de un mecanismo de presión correspondiente a una célula de carga (101) para el ensayo de flexión. El ensayo de flexión se basa en aplicar una fuerza puntual sobre el borde libre de la
20 lámina ungueal (120) y medir un valor de fuerza que causa la flexión del borde libre de la lámina ungueal (120).

- 25 En esta realización, el dispositivo (100) comprende un chasis (104) de poliláctico (PLA) para el soporte de los diferentes elementos electromecánicos y ópticos que permiten la obtención de medidas para la determinación de la consistencia de la lámina ungueal (120) de una uña de un usuario "in vivo".

- 30 El chasis (104) comprende una longitud de 130 mm, 170 mm de anchura y 110 mm de altura. El chasis (104) puede comprender otras dimensiones siempre que permitan el soporte y sujeción de los diferentes elementos electromecánicos.

- 35 Como se observa en la figura 1A, el chasis (104) se compone principalmente de un bloque central (112) donde se realiza el acople de uno o más componentes de medición en función del tipo de pruebas a realizar. El dispositivo (100) consta de una base superior (104a) y una base inferior (104b) que se ensamblan en los laterales del dispositivo (100), unas varillas

ES 2 784 799 B2

(111) que restringen la rotación del bloque central (112) y un doble eje de transmisión que comprenden correa (107a), engranajes (107b) y tornillos sinfin (107c). Además, la base superior (104a) sirve de apoyo y sujeción del actuador, que es un motor paso a paso (106). La base inferior (104b) sirve de plataforma para situar el dedo del usuario y un sensor de fuerza resistivo (FSR) (103).

El chasis (104) comprende las aperturas (114) para permitir la grabación del proceso de ensayo. El dispositivo (100) comprende unos medios de captación ópticos que comprenden una cámara (102a), que se muestra en la figura 1C, para medir la curvatura de la uña y el grosor de la lámina ungueal, así como la grabación del ensayo. Además el dispositivo (100) comprende un fotodetector (102b), que se muestra en la figura 1B, para captar el cambio de coloración en el lecho ungueal asociado al corte del riego sanguíneo y registrar e identificar el colapso del lecho ungueal. En otra realización, los medios de captación ópticos únicamente comprenden la cámara (102a), la cual lleva a cabo las funciones del fotodetector (102b).

Para realizar los ensayos de flexión de la lámina ungueal (120), el dispositivo (100) cuenta con un mecanismo de desplazamiento de la célula de carga (101) (o fuerza puntual), situado en el bloque central (112). Tanto la lámina ungueal (120) como el dispositivo de carga (101) se observan en la figura 1B. El mecanismo de desplazamiento consiste en el sistema de correa y engranajes (107a, 107b) que transmite el movimiento angular del motor paso a paso (106) al eje del bloque central (112), transformando la rotación en un movimiento lineal, siendo la pieza móvil el bloque central (112). La unión entre el bloque central (112) y el eje de transmisión se logra a través de una tuerca métrica y un tornillo sinfín (107c). Con este diseño se consigue limitar el movimiento de la célula de carga (101) únicamente en el eje vertical y con un movimiento unidireccional, es decir, desde el motor paso a paso (106) a la célula de carga (101).

El desplazamiento del bloque central (112) se basa en un doble eje central de transmisión, mientras las varillas laterales (111) sirven de guía e impiden cualquier tipo de rotación. La razón principal de utilizar el sistema de transmisión mencionado reside en evitar una acción continua del motor paso a paso (106) sobre la lámina ungueal (120) para ejercer una fuerza (presión) constante o variable. A través de esta configuración se logra reducir el par-motor necesario y aumentar la precisión, con una relación de transmisión entre los engranajes (107b) de $n = \frac{18}{90}$ y un coeficiente de transmisión del movimiento angular a lineal de $r =$

ES 2 784 799 B2

$\frac{1,25}{2\pi}$ mm/(rad/s). Sin embargo, se puede definir un protocolo de seguridad y establecer unas condiciones de parada para evitar ocasionar cualquier tipo de daño al usuario por un fallo no controlado o imprevisto.

- 5 El diseño eléctrico y electromecánico del dispositivo (100) se encuentra íntimamente ligado al diseño mecánico y los requisitos solicitados. Para garantizar la versatilidad del dispositivo (100) se ha optado por el desarrollo de un sistema embebido adecuado a las necesidades requeridas. Las características técnicas del sistema desarrollado se muestran en la Tabla 1.

Parámetro	Intervalo	Unidades
Alimentación	220-230	VAC
Corriente máxima	0,566	A
Conexión de datos		Micro-B
Fuerza máxima de aplicación	2,27	kgf

10 Tabla 1: Características generales del dispositivo (100).

Un esquema conceptual de los dispositivos que integran el dispositivo (100) se muestra en la figura 2.

- 15 Los medios de computación comprenden una unidad de control (105a), mostrada en las figuras 1A, y 1C y 2, que en la presente realización es un microcontrolador de propósito general de 8-bits con una frecuencia de instrucción lo suficientemente alta (por ejemplo, 4 MHz) que permite clasificar el dispositivo (100) como un sistema de tiempo real. La unidad de control (105a) comprende diferentes interfaces de comunicación serie, como por ejemplo
- 20 las interfaces I2C e SPI, para comunicarse con otros elementos del dispositivo (100), y una interfaz o puerto de conexión USB (109) y una interfaz Ethernet (110) para la comunicación directa con un ordenador sin la necesidad de añadir adaptadores de señal. La comunicación de los componentes descritos en la figura 2 se realiza mediante la programación software del microcontrolador escogido.

- 25 En dicha realización preferente, se incluye una placa de prototipado (108) que integra la unidad de control (105a) y ofrece la posibilidad de una programación rápida y un acceso rápido y sencillo al resto de interfaces, como el puerto USB (109) y una interfaz Ethernet (110).

30

ES 2 784 799 B2

Los medios mecánicos comprenden el motor paso a paso (106) empleado para accionar la célula de carga (101) mostrada en las figuras 1 y 2. El motor paso a paso (106) funciona como un transductor electromecánico que convierte un pulso digital en una rotación mecánica. Este motor (106) ofrece un gran número de ventajas, tales como su sencillez
5 pues no hay fricción a causa de la ausencia de escobillado, su bajo coste, su elevada fiabilidad, alto par-motor a bajas velocidades y su elevada precisión de movimiento. Se ha escogido un motor paso a paso bipolar, caracterizado por energizar el bobinado completo y utilizar un microcontrolador de puente completo, además de un sensor final de carrera (FC) (122) para limitar el movimiento del motor. Una ventaja complementaria a las citadas es la
10 capacidad de utilizar el motor como sensor de posición. Las especificaciones técnicas del motor paso a paso (106) son un par de 48 N·c/m y una resolución de 400 pasos por revolución.

Adicionalmente, para excitar correctamente los bobinados del motor paso a paso (106) se
15 incluye una electrónica de control que comprende un circuito integrado (IC) incluido en la placa de prototipado (108), donde se muestran también el conector y los cables de conexión (105b). Con esta etapa es posible controlar el sentido de giro o bloqueo del motor paso a paso (106) a través de la unidad de control (105a). Será por lo tanto la unidad de control (105a) la que determine su modo de funcionamiento en base a su programación. La
20 electrónica empleada comprende un IC y la circuitería necesaria para garantizar un funcionamiento adecuado del IC. El IC integra dos puentes en H completos capaces de manejar los altos voltajes e intensidades requeridos por el motor paso a paso (106). Además, incorpora una parte digital encargada de simplificar la tarea de control y conmutación de los puentes en H a un reducido número de señales digitales.
25 Adicionalmente, incorpora la funcionalidad de "microstepping", permitiendo aumentar la resolución de movimiento hasta 16 veces.

En la figura 1B puede verse una imagen del posicionamiento de la lámina ungueal y la célula de carga (101) en el banco de pruebas antes de iniciar las medidas. El fotodetector (102b)
30 puede detectar el cambio de coloración del lecho ungueal producido en la lámina ungueal (120) mediante una longitud de onda cercana a 525 nm. El fotodetector (102b), de acuerdo con la realización preferente, incluye tres leds, fotodetectores, elementos ópticos y la electrónica de reducción de ruido con rechazo de luz ambiental. El fotodetector (102b) incorpora un led verde con una longitud de onda de 537 nm, y adicionalmente, un led
35 infrarrojo y un led rojo con longitud de onda de 880 nm y 660 nm, respectivamente. El fotodetector (102b) incorpora un conversor A/D (121) de 18 bits que evita la adición de ruido

ES 2 784 799 B2

por el uso de convertidores externos. La comunicación con la unidad de control (105a) se implementa a través un protocolo digital, como por ejemplo el I2C, que permite aumentar la inmunidad al ruido. El control del fotodetector (102b) se realiza a través de la placa de prototipado (108).

5

La realización de las figuras 1A, 1B y 1C comprende la célula de carga (101) adaptada para aplicar una fuerza puntual sobre el borde libre de la lámina ungueal (120). La realización de las figuras 1A, 1B y 1C comprende una célula de carga (101) tipo botón o "cantilever". En otras realizaciones, el mecanismo de presión puede comprender un muelle. La célula de carga (101) tipo "cantilever" permite determinar la fuerza ejercida de una forma más precisa y sencilla, así como visión directa entre la lámina ungueal (120) y el fotodetector (102b).

10

Para escoger adecuadamente el modelo de célula de carga (101) del dispositivo (100) se realizaron varios ensayos de compresión con una uña postiza. El objeto de esta serie de ensayos fue determinar el rango de fuerzas que pueden producir la flexión de la uña del usuario mediante la aplicación de un valor de fuerza en la lámina ungueal (120). Aunque el material de la uña postiza no se corresponde exactamente con la composición de la lámina ungueal (120), es posible tratarlo como un material intermedio que presenta un comportamiento equivalente a una uña de consistencia media. En las figuras 3A y 3B se muestran los resultados obtenidos para dos pruebas con diferentes perfiles de velocidad. Así pues a partir de estos ensayos, se puede extraer un rango de fuerzas de compresión para aplicar sobre la lámina ungueal (120) del orden de $\pm 2,5$ kgf. Para fuerzas de compresión superiores, ya se ha alcanzado la máxima deflexión del material y éste comienza a deformarse en conjunto con su soporte. En base a dichas pruebas, el modelo de célula de carga (101) de la realización preferente de las figuras admite una fuerza máxima de 2,27 kgf, aunque puede soportar hasta 3,5 kgf.

15

20

25

La célula de carga (101) mostrada en las figuras 1A, 1B y 1C se basa en una lámina de acero inoxidable sobre la cual se implementa un puente de Wheatstone, con las correspondientes resistencias de corrección. Las propiedades mecánicas de la lámina, en conjunto con instrucciones de los medios de computación, determinan la fuerza aplicada a partir de la deflexión producida en la lámina ungueal (120). El acero inoxidable confiere a la célula de carga (101) un módulo de Young de 200 GPa. Considerando como aplicación homóloga una viga empotrada soportando una fuerza puntual sobre su extremo libre, se obtiene un desplazamiento teórico de $2,57 \mu\text{m/gf}$.

30

35

ES 2 784 799 B2

Para poder registrar la desviación producida en el puente de Wheatstone, se puede usar el conversor A/D (121). Concretamente la electrónica empleada con el IC incorpora un conversor analógico-digital sigma-delta de 24bits. La comunicación con el IC se realiza a través de un protocolo SPI. La implementación de este protocolo implica un mayor uso de tiempo de la unidad de control (105a), aumentado así la probabilidad de ser interrumpida por acciones de mayor prioridad, cuyo resultado es un fallo en la comunicación y la lectura de valores erróneos.

La célula de carga (101), en una primera instancia, puede considerarse como un muelle elástico con una rigidez a la deformación mayor que el sistema de estudio. A continuación se describen algunos estudios llevados a cabo para modelar la célula de carga (101) como un muelle.

Previamente a realizar un análisis empírico del comportamiento elástico de la célula de carga (101), ésta se ha caracterizado teóricamente considerando su modo de empleo como una viga empotrada sobre la que se aplica una carga puntual. Por otro lado, para facilitar el análisis se ha tomado como referencia una sección uniforme de la célula de carga (101), con ausencia de perforaciones. De acuerdo a esto, la flexión que experimenta la célula de carga (101) se observa en la figura 4 y puede determinarse a partir de la siguiente ecuación:

20

$$\delta(t) = F(t) \frac{1}{6EI} (L - d)^2 (2L + d)$$

donde $F(t)$ es la fuerza ejercida sobre la célula de carga (101), L es la longitud de la célula de carga (101) desde su empotramiento, E es el módulo de Young, I es el momento de inercia de la sección y d es la distancia entre el punto de aplicación de la fuerza y el extremo. A partir de ella se calcula la inversa de la constante de elasticidad (K) del muelle equivalente como:

25

$$\frac{1}{K} = \frac{1}{6EI} (L - d)^2 (2L + d)$$

Para $d = 2\text{mm}$, se obtiene un valor teórico para este parámetro de $2,5764 \mu\text{m/gf}$.

Para validar el modelo considerado y corroborar el resultado obtenido, se realizó un conjunto de dieciséis pruebas agrupadas en cuatro bloques de velocidades de desplazamiento diferentes. Las pruebas consistieron en someter a la célula de carga (101) a una fuerza gradual de hasta 1 kgf y registrar la deflexión originada. Dicha fuerza fue aplicada a una

ES 2 784 799 B2

distancia de 2,5 mm del extremo. Los resultados, referidos a la inversa de la constante elástica K , se muestran en la Tabla 2.

Velocidad ($\mu\text{m/s}$)	173,49	347,04	519,36	692,32
1° Ensayo ($\mu\text{m/gf}$)	2,5930	2,5060	2,5342	2,4960
2° Ensayo ($\mu\text{m/gf}$)	2,5661	2,5546	2,5284	2,5721
3° Ensayo ($\mu\text{m/gf}$)	2,5703	2,4969	2,5389	2,4926
4° Ensayo ($\mu\text{m/gf}$)	2,5256	2,4717	2,5312	2,4163
Promedio de Ensayos	2,5637	2,5069	2,5332	2,4930

Tabla 2: Ensayos para la caracterización de la célula de carga.

5

El valor promedio del conjunto de pruebas para la inversa de la constante elástica K es 2,5242 $\mu\text{m/gf}$, que difiere en un 2,0261% del obtenido teóricamente, pero que puede despreciarse teniendo en cuenta la consideración realizada. En la figuras 5A a 5D se representan los datos obtenidos durante las pruebas, en las cuales se evidencia un claro carácter lineal.

10

El dispositivo (100) también comprende una cámara (102a), como se observa en la figura 1C. La cámara (102a) puede medir la curvatura de la uña previo al ensayo de flexión mediante la célula de carga (101) y el grosor de la lámina ungueal (120). La cámara puede ofrecer la función de seguir el proceso "in vivo" para controlar el ensayo.

15

Adicionalmente, el dispositivo (100) comprende el FSR (103), que puede no estar incluido en otras realizaciones de la invención. El FSR (103) puede usarse para obtener una medida de la compresión del dedo que puede ser usada para modificar, ponderar, corregir, etc. el valor de fuerza medida con la célula de carga (101) que causa la flexión del borde libre de la lámina ungueal (120).

20

El FSR (103) es un sensor de película de polímero que presenta una disminución de la resistencia cuando aumenta la fuerza aplicada a la superficie activa. El FSR (103) se halla en la base del dispositivo, lugar sobre el que se coloca el dedo del usuario. El FSR (103) puede obtener una medida de la compresión del dedo, durante la deformación de la uña. El FSR (103) se trata de un sensor con un límite de 5 kgf. Su valor de salida es una tensión que puede ser leída por la unidad de control (105a) del dispositivo (100).

25

ES 2 784 799 B2

La comunicación de los componentes previamente descritos se realiza mediante la programación software de la unidad de control (105a). Así pues, se aborda el funcionamiento principal del dispositivo (100) y los métodos programados para gestionar los recursos del dispositivo (100). Además, se detallan las mediciones realizadas para calibrar y
5 definir el modo de funcionamiento de los componentes electromecánicos descritos.

La programación implementada en esta realización en particular para gestionar los recursos del dispositivo (100) se desarrolla bajo el concepto de multitarea y actuación por interrupciones. Se ejecutan un conjunto de acciones de forma secuencial pero acometidas
10 en diferentes periodos de tiempo. En cuanto al carácter de actuación por interrupciones, se basa en la ejecución de instrucciones predefinidas ante unas condiciones previstas.

La estructura del programa principal se esquematiza en la figura 6, que comprende dos etapas principales: inicialización (601) y ejecución (602).

15 La primera etapa de inicialización (601) configura los diferentes módulos hardware de la unidad de control (150a), el modo de funcionamiento del fotodetector (102b) y el conversor A/D (121) de la célula de carga (101). La etapa de inicialización (601) comprende el paso (601a) para la configuración y declaración de interfaces I/O, una etapa (601b) de
20 configuración de la célula de carga, una etapa (601c) para la configuración del sensor óptico y una etapa (601d) para la configuración de la unidad aritmética. La recepción de un comando de control de inicio en el paso (601e) permite pasar a la etapa de ejecución (602). La última acción de la etapa (601) consiste en establecer y verificar la conexión con la interfaz HMI. Para asegurar la conexión con la interfaz de control del dispositivo (100), se
25 debe verificar la recepción del comando de control de inicio en el paso (601e). En el supuesto de no satisfacer esta condición, el dispositivo (100) se encontrará bloqueado, y no se permitirá el movimiento manual de la célula de carga (101) como medida de seguridad.

La etapa de ejecución (602) se encuentra estructurada en dos bucles centrales: ejecución
30 (603a) y eventos (603b). La ejecución del primero (603a) es secuencial e iterativa. Dentro de él se distinguen tres conjuntos de acciones atendidas según su prioridad a las frecuencias de 100 Hz para el paso (604a) para la actualización y filtrado de variables, frecuencias de 50 Hz para el paso (604b) para la comprobación de condiciones de parada y comunicación con la interfaz HMI y frecuencias de 0,5 Hz para el paso (604c) para parada de emergencia. El
35 bloque de eventos (603b) se ejecuta de forma prioritaria y asíncrona, atendiendo a los requerimientos establecidos previamente.

ES 2 784 799 B2

La actualización de las medidas procedentes de la célula de carga (101) y del fotodetector (102b), así como su correspondiente filtrado mediante un filtro de Kalman, se realizan dentro del bucle de 100 Hz. Esto asegura la capacidad de observar la dinámica del sistema en estudio, sin problemas de muestreo. Por otro lado, para evitar la pérdida de información durante la comunicación con la interfaz de control HMI, las variables de interés pueden ser acumuladas en un buffer de memoria, permitiendo un retardo de lectura de 320 ms. Además, dentro del bucle de ejecución (603a) se deben ejecutar las acciones correspondientes a los bucles de 50 y 0,5 Hz, como consecuencia del carácter pseudo-multitarea de la programación.

10

El bucle de 50 Hz se centra en verificar la condición de parada del ensayo y establecer la comunicación con la interfaz de control. La condición de parada es activada cuando se alcanza la máxima fuerza aplicable. El último bucle de 0,5 Hz se encarga de comprobar la condición de parada y detener el ensayo, retirando la célula de carga (101).

15

La fuerza ejercida por la célula de carga (101) puede ser controlada de forma indirecta a través de su desplazamiento mediante el control de posición del motor paso a paso (106). La célula de carga (101), como se ha detallado anteriormente, es trasladada por el eje principal, cuya velocidad lineal, y por lo tanto posición, se encuentra determinada por el sistema de transmisión con el conjunto de engranajes (107b, 107b) y el motor paso a paso (106). La velocidad angular del motor paso a paso (106) se define exclusivamente por un controlador en lazo abierto, ya que, para el tipo de motor paso a paso (106) escogido, la velocidad angular (ω_m) viene determinada por el intervalo de tiempo entre pulsos de excitación (δt) y la resolución de desplazamiento (número de pulsos por revolución, spr):

25

$$\omega_m = \frac{2\pi}{(spr)\delta t}$$

El parámetro spr es una característica intrínseca al tipo de motor paso a paso (106) escogido. Sin embargo, el driver empleado ofrece la funcionalidad de “*microstepping*”. Esta opción permite ampliar el número de pulsos necesario para realizar una revolución, aumentando así la precisión de movimiento. En la configuración de este modo de operación se ha escogido la máxima resolución posible: $spr = 6400$ (resolución de 6400 pulsos por revolución).

30

ES 2 784 799 B2

El control de posición implementado se basa en un algoritmo de velocidad. A diferencia de otros métodos de implementación, este algoritmo permite alcanzar una posición de forma suave, incorporando un perfil de velocidad sin paradas instantáneas que obligan a utilizar electrónica con altos valores umbrales de corriente y tensiones de pico. Además, el algoritmo incorpora la parametrización y cálculo en tiempo real de los parámetros: aceleración, velocidad, posición y desaceleración. Adicionalmente, la electrónica empleada simplifica la tarea de control al ocuparse de la generación de las señales de conmutación.

El perfil de velocidad se define como representa la figura 7. El motor paso a paso (106) comienza con una velocidad cero y acelera hasta alcanzar la velocidad deseada. La velocidad se mantiene constante hasta entrar en desaceleración. A partir de ese momento, el motor paso a paso (106) desacelera hasta detenerse transcurridos el número de pasos indicados. La caracterización del perfil de velocidad se basa en determinar la distancia a la que se alcanza la velocidad máxima de acuerdo a la aceleración especificada y cuándo se debe comenzar a desacelerar para finalizar en la posición indicada.

Una vez caracterizado el perfil de velocidad, se calcula el intervalo de excitación a través de una máquina de estados.

La transición entre estados se produce cuando se alcanza la distancia predefinida por el perfil de velocidad. Respecto a las acciones realizadas en cada estado, éstas se reducen exclusivamente a dos con objeto de reducir el tiempo de cómputo: la primera, definir el periodo de tiempo en el que debe producirse la siguiente excitación y la segunda, comprobar si se produce una transición de estado.

La implementación de la máquina de estados se realiza mediante actuación por interrupciones y con ayuda de la estructura de datos "*speedRampData*", que almacena en memoria la información correspondiente a las condiciones de transición, el estado actual, sentido de giro del motor paso a paso (106) y el intervalo de tiempo en el que se deberá generar la próxima señal de excitación. Al mismo tiempo, dicho intervalo de tiempo es utilizado para activar la interrupción en la que se ejecuta la máquina de estados. Es necesario matizar que las variables cinemáticas han sido escaladas por un factor de 100, con el objetivo de optimizar el tiempo de procesamiento del microcontrolador. De esta forma, se consigue evitar el uso de la aritmética de coma flotante y mantener el mismo grado de precisión.

ES 2 784 799 B2

La expresión que relaciona la velocidad angular del motor paso a paso (106) y el desplazamiento ($x(t)$) de la célula de carga (101) es:

$$x(t) = 3,927 \cdot 10^{-6} \omega_m(t) (\text{m/s})$$

5

En la Tabla 3 se muestra, para un conjunto de cuatro pruebas, las velocidades experimentales generadas y la velocidad teórica. Además, se indica el factor de corrección que debe aplicarse para conocer la velocidad real generada.

10

Velocidad ($\mu\text{m/s}$)				
Teórica	79,57	159,15	238,73	318,30
1º Ensayo	173,48	346,92	519,29	692,13
2º Ensayo	173,49	347,10	519,32	692,93
3º Ensayo	173,49	347,08	519,31	692,14
4º Ensayo	173,48	347,05	519,52	692,06
Promedio de Ensayos	173,49	347,04	519,36	692,32
Factor de Corrección	2,180	2,180	2,175	2,175

Tabla 3: Ensayos de comprobación de velocidad.

De los resultados mostrados en la tabla anterior, se obtiene que la velocidad teórica se corresponde con la velocidad generada aplicando un factor de corrección de 2,177. Por lo tanto, la expresión anterior es reescrita como:

15

$$x(t) = 2,177 \cdot 3,927 \cdot 10^{-6} \omega_m(t) = 8,549 \cdot 10^{-6} \omega_m(t) (\text{m/s})$$

Anteriormente, se ha descrito el uso del conversor A/D (121) para determinar la diferencia de potencial que produce el puente de Wheatstone incorporado en la célula de carga (101) y así determinar la fuerza que se está aplicando en cada instante de tiempo. El conversor A/D (121) escogido permite configurar la ganancia de la etapa preamplificadora que incorpora y la velocidad de muestreo de la señal, siendo esta última configuración determinada por hardware.

20

La ganancia de la etapa de preamplificación escogida es la máxima posible, es decir, de 128. Esto permite aumentar la resolución de la célula de carga (101) y la relación

25

ES 2 784 799 B2

señal/ruido. La frecuencia de muestreo escogida de 80 Hz es la máxima permitida por las características del conversor A/D (121) con el objeto de registrar el mayor espectro posible. La lectura del conversor A/D (121) se realiza mediante una programación sencilla, basada únicamente en implementar el protocolo de comunicación y leer el valor devuelto por el módulo de comunicación del conversor A/D (121). Por otro lado, durante la etapa de inicialización (601) se realiza la calibración de offset o error a carga nula. Esta consiste en calcular la desviación del puente de Wheatstone para una carga nula y compensar la desviación en las medidas futuras. Además, se establece el factor de conversión gf/bit, que puede ser calculado de forma empírica. Las pruebas realizadas para cuantificar dicho factor se basaron en someter a la célula de carga (101) a una fuerza conocida y registrar el valor digital medido (en valor medio), como se muestra en la Tabla 4.

	Nº muestras	Valor medio (bit)	Fuerza aplicada (gf)	Factor de conversión (µgf/bit)
1º Ensayo	1900	2395945	1000	417,37
2º Ensayo	3400	2418321	1000	413,51
3º Ensayo	1990	2438478	1002	410,91
4º Ensayo	7100	2416847	997	412,52
5º Ensayo	6500	2434590	1002	411,57

Tabla 4: Ensayos de calibración de la célula de carga.

15 En base a los resultados anteriores se determinó un factor de conversión de 413,17 µgf/bit.

Para garantizar las mismas condiciones de partida y actuación para cada ensayo e individuo, y consecuentemente asegurar la consistencia de las mediciones, se ha establecido un protocolo de ensayo. El protocolo se encuentra dividido en tres etapas: inicio, actuación y fin. La primera etapa se debe exclusivamente al usuario responsable de la gestión del dispositivo (100) y al paciente; en cambio, las dos últimas se encuentran definidas y configuradas vía software.

25 La etapa de actuación tiene como objeto posicionar la célula de carga (101) sobre el borde libre de la lámina ungueal (120). Para lograr este propósito, se realizan un conjunto de acciones de forma secuencial, definidas por la máquina de estados mostrada en la figura 8, las cuales se basan en: inicialización de variables, aproximación hacia la lámina ungueal (120) hasta su detección, control de fuerza sobre la lámina ungueal (120) de 10 gf y

ES 2 784 799 B2

calibración del fotodetector (102b) de acuerdo con las condiciones del entorno y las características de reflexión de la lámina ungueal (120).

5 Establecidas las condiciones anteriores, se comienza el ensayo hasta alcanzar la fuerza máxima establecida. Una vez alcanzada la máxima fuerza de ensayo, comienza la última etapa, en la cual la célula de carga (101) retrocede a la posición de inicio, garantizando una retirada cómoda y segura del dedo, además de evitar cualquier tipo de colisión no deseada con los sensores.

10 Mediante este protocolo se pretende estandarizar las mismas condiciones iniciales con independencia de la morfología del dedo del paciente.

15 Para facilitar el uso del dispositivo (100), se ha desarrollado un ejemplo de una aplicación de escritorio HMI (1000) para ofrecer al usuario una forma rápida y sencilla de realizar ensayos y visualizar los datos. La aplicación HMI (1000) evita la necesidad de recurrir a programas de cálculo o aplicación específica, fuera del campo de conocimiento de un usuario básico. Además, para proporcionar una mayor comodidad a los usuarios, la aplicación HMI (1000) es multiplataforma, es decir, soporta diferentes sistemas operativos.

20 En la figura 9 se muestra la ventana principal de la aplicación HMI (1000) para el dispositivo (100) con nombre "Medidor de la consistencia ungueal" o "MCU", que se encuentra estructurada en cuatro áreas:

25 – Herramientas (1010): Comprende la barra de herramientas donde se encuentran las funciones básicas de la aplicación HMI (1000) (por ejemplo, guardar y abrir archivos) y la configuración de parámetros especiales del dispositivo (100). Concretamente, el área de herramientas (1010) permite modificar el umbral de detección de color y la fuerza máxima que será aplicada durante los ensayos.

30 – Comandos de control (1020): Zona de la interfaz que agrupa los principales comandos de acción del dispositivo. Contiene acciones para detectar y conectarse al puerto de conexión USB (109) al que se encontrará conectado, modificar la velocidad de desplazamiento de la célula de carga (101) y controlar su desplazamiento, y reiniciar el dispositivo (100) a sus condiciones iniciales. Además, los comandos de

ES 2 784 799 B2

control (1020) comprenden un botón específico "RUN" para iniciar los ensayos. Este botón aparecerá como "STOP" durante el funcionamiento del dispositivo (100).

- 5 – Información del dispositivo (1030): Zona de la interfaz que está compuesta por dos indicadores, "position" y "force", que informan en todo momento sobre la posición de la célula de carga (101) respecto a su posición inicial y la fuerza ejercida, respectivamente.
- 10 – Representación de datos durante el ensayo (1040): Zona de la interfaz que muestra una representación gráfica en tiempo real de los datos (posición respecto a fuerza) obtenidos durante el ensayo. Esta misma área puede ser utilizada para representar los datos correspondientes a otros ensayos guardados.

15 Respecto a la programación, la aplicación HMI (1000) puede ser realizada en un lenguaje de programación, como por ejemplo Python, implementándose la lectura y visualización de los datos a través de una programación concurrente y la demanda de peticiones del usuario a través de interrupciones.

20 El presente documento incluye un ejemplo de una guía de ruta para el uso del dispositivo (100). Se explicarán los pasos que deben seguir para poner en funcionamiento el dispositivo (100) y comenzar a realizar ensayos. Además, se indica, por ejemplo, como guardar los datos registrados o visualizar la información obtenida en otros ensayos, cuyos datos fueron guardados previamente.

25 Se parte de la conexión del dispositivo (100) a un ordenador personal (PC) a través de un cable USB – microUSB y puerto de conexión USB (109). La conexión del PC con el dispositivo (100) se puede realizar con los siguientes pasos:

- 30 1. Identificar el puerto de conexión al que se encuentra conectado el dispositivo (100). Para ello, se pulsa el botón "Refresh" (situado en el área de comandos de Control (1020)).
2. Se selecciona, a través del menú (1012) desplegable, el puerto al que se encuentra conectado. El menú (1012) se encuentra ubicado justamente debajo del botón "Refresh" del área de comandos de control (1020).

ES 2 784 799 B2

3. Se pulsa el botón "Connect". Si la conexión se logra satisfactoriamente, aparecerá el botón "Disconnect". En caso contrario, puede no establecerse la comunicación debido a uno de los siguientes errores:
- 5 a) el puerto seleccionado no se corresponde con el del dispositivo (100). La solución vendría dada por probar otros puertos, o
- b) el cable no se encuentra bien conectado. La solución vendría dada por comprobar las conexiones.

Una vez que el dispositivo (100) se encuentra conectado al PC se disponen de varias opciones: Llevar a cabo un control manual sobre el mecanismo de la célula de carga (101) o

10 inicio del ensayo. El control manual es realizado por los controles del área de comandos de control (1020). La posición de la célula de carga (101) y la fuerza ejercida serán indicadas en todo momento a través del área de información (1030) del dispositivo (100). Respecto a la segunda opción, el inicio del ensayo se comienza haciendo click en el botón "RUN" del

15 área de comandos de control (1020). A partir de ese instante se realizan un conjunto de acciones automáticas que dan lugar al inicio del ensayo. Desde el inicio del ensayo, tanto en el área de información (1030) del dispositivo (100) como en la de representación de datos (1040), se comienza a visualizar los datos registrados. El ensayo puede ser parado en cualquier instante pulsando el botón "STOP".

20 Este provocará la parada inmediata de la célula de carga (101) y su retroceso a la posición de inicio. Para repetir un nuevo ensayo es necesario reiniciar el dispositivo (100), en caso contrario no se podrá comenzar. Por lo tanto, una vez finalizado un ensayo es necesario pulsar el botón "Reset" y seguidamente "RUN" del área de comandos de control (1020).

25 Finalizado el ensayo se dispone de la opción de guardar los datos en un archivo *.ffx*. La opción de guardado se encuentra en la pestaña "File" de la barra de herramientas (1010). En la misma pestaña también se encuentra la opción de abrir datos guardados.

30 Por otro lado, los parámetros fuerza máxima y valor umbral de detección de color se modifican con la opción "Settings" de la barra de herramientas (1010). Es necesario indicar que dichos parámetros son reiniciados a sus valores por defecto cada vez que se inicia la aplicación HMI (1000).

ES 2 784 799 B2

La aplicación HMI (1000) puede ser cerrada en cualquier momento, aunque se recomienda que ésta sea cerrada cuando haya finalizado la comunicación con el dispositivo, si hubiera sido establecida.

- 5 Se ha establecido un protocolo de ensayo con objeto de garantizar, en la medida de lo posible, las mismas condiciones de partida y actuación para cada ensayo e individuo y, consecuentemente, asegurar la consistencia de las mediciones. El protocolo se encuentra dividido en cuatro etapas: captura de imagen, inicio, actuación y fin.
- 10 La captura de imagen con la cámara (102a) nos permite conocer la curvatura de la uña y el grosor de la lámina ungueal (120), previo a la realización del ensayo. La imagen capturada será posteriormente procesada, dando una curvatura de la uña y un grosor de la lámina ungueal (120). Esta foto será tomada cuando se pulse el botón "RUN" del área de comandos de control (1020) del dispositivo (100) para realizar el ensayo, una vez colocado el pie en la
- 15 posición inicial.

- La etapa de inicio está referida al posicionamiento adecuado de la lámina ungueal (120) del primer dedo del pie de cada individuo en el banco de pruebas para estandarizar las mismas condiciones de medida para los diferentes ensayos e individuos. Es la fase más decisiva
- 20 para asegurar la reproducibilidad de los datos y, al mismo tiempo, la más difícil debido a los factores humanos y mecánicos que intervienen. Para tal fin, se establecen dos principios. En primer lugar, el operario del dispositivo (100) deberá asegurar de manera manual las siguientes condiciones, según el orden indicado:

- 25 1. La lámina ungueal (120) no debe introducirse por debajo de la célula de carga (101) una longitud superior a 3 mm a partir del inicio del borde libre. En caso contrario, se impediría la correcta determinación del cese de riego sanguíneo en el lecho ungueal mediante el fotodetector (102b). Opcionalmente, el cese de riego sanguíneo en el lecho ungueal se puede determinar con la cámara (102a).
- 30 2. Una vez posicionada la lámina ungueal (120), se realiza el siguiente conjunto de acciones de forma automática, ya preconfiguradas en el dispositivo (100), que tienen como objetivo la adecuación del medidor a la morfología del dedo del individuo:
- 2.1 Inicialización de variables.
- 2.2 Aproximación de la célula de carga (101) a la lámina ungueal (120) hasta su
- 35 detección.
- 2.3 Verificación de que se ejerce una presión de 10 gf sobre la lámina ungueal.

ES 2 784 799 B2

2.4 Calibración del fotodetector (102b) de acuerdo con las condiciones del entorno y las características de reflexión de la lámina ungueal (120).

Una vez completados los pasos anteriores, tiene lugar la etapa de actuación. A diferencia de la anterior, en ésta intervienen únicamente factores mecánicos. Se encuentra definida principalmente por dos parámetros: la fuerza de aplicación máxima y la velocidad de actuación. Los valores por defecto para los ensayos son 1000 gf y 518 $\mu\text{m/s}$ (teórica), respectivamente.

Finalmente, la etapa de fin, íntimamente relacionada con la etapa anterior, comienza cuando la célula de carga (101) alcanza la fuerza de aplicación máxima indicada. A partir de este momento, la célula de carga (101) retrocede hasta la posición de reposo o inicio. De este modo, se garantiza una retirada cómoda y segura del dedo, evitando que éste pueda colisionar con algún sensor del dispositivo (100).

15

ES 2 784 799 B2

REIVINDICACIONES

- 5 1. Dispositivo (100) para la obtención de medidas para la determinación de la consistencia de una lámina ungueal (120) de una uña de un usuario "in vivo", la lámina ungueal comprende un borde libre y está asociada a un lecho ungueal, **caracterizado por que** comprende:
- 10 a) un mecanismo de presión (101) adaptado para:
- aplicar fuerza puntual sobre el borde libre de la lámina ungueal; y
 - medir un valor de fuerza que causa la flexión del borde libre de la lámina ungueal; y
- 15 b) medios de captación ópticos (102a, 102b) configurados para:
- captar la curvatura de la uña antes de aplicar la fuerza puntual sobre el borde libre de la lámina ungueal (120);
 - medir el grosor de la lámina ungueal (120); y
 - captar un cambio de coloración del lecho ungueal causado por la flexión del borde libre de la lámina ungueal (120).
- 20 2. El dispositivo (100) de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:
- un sensor de fuerza resistivo (FSR) (103) configurado para obtener una medida de la compresión del dedo.
- 25 3. El dispositivo (100) de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, donde el mecanismo de presión comprende una célula de carga (101).
4. El dispositivo (100) de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, donde los medios de captación ópticos comprenden una cámara (102a).
- 30 5. El dispositivo (100) de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, donde los medios de captación ópticos comprenden:
- una cámara (102a) configurada para:
- captar la curvatura de la uña antes de aplicar fuerza puntual sobre el borde libre de la lámina ungueal;
 - medir el grosor de la lámina ungueal (120); y

ES 2 784 799 B2

un fotodetector (102b) configurado para captar el cambio de coloración del lecho ungueal causado por la flexión del borde libre de la lámina ungueal.

- 5 6. Método para la obtención de medidas para la determinación de la consistencia de una lámina ungueal (120) de una uña de un usuario "in vivo", donde la lámina ungueal (120) comprende un borde libre y un lecho ungueal. El método comprende:
- 10 - captar la curvatura de la uña mediante unos medios de captación ópticos (102a, 102b);
- medir el grosor de la lámina ungueal (120) mediante los medios de captación ópticos (102a);
- aplicar fuerza puntual sobre el borde libre de la lámina ungueal (120) mediante un mecanismo de presión (101);
- 15 - medir un valor de fuerza que causa la flexión del borde libre de la lámina ungueal mediante el mecanismo de presión (101);
- captar un cambio de coloración del lecho ungueal asociado con la flexión del borde libre de la lámina ungueal (120) mediante los medios de captación ópticos (102b), y
- 20 - estimar la consistencia de la lámina ungueal (120) basándose en el valor de fuerza que causa la flexión del borde libre de la lámina ungueal (120), el grosor de la lámina ungueal (120), la curvatura de la uña y el cambio de coloración del lecho ungueal.
- 25 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende:
- obtener una medida de la compresión del dedo mediante un sensor de fuerza resistivo (FSR) (103);
- ponderar el valor de fuerza que causa la flexión del borde libre de la lámina ungueal (120) con la medida de la compresión del dedo; y
- 30 - estimar la consistencia de la lámina ungueal (120) basándose también en el valor ponderado de fuerza.
8. El método de acuerdo con las reivindicaciones 6 y 7, que adicionalmente comprende:

ES 2 784 799 B2

- clasificar tipo de uñas de un usuario como uñas duras o blandas basándose en la consistencia de la lámina ungueal.
- 5 9. El método de acuerdo con las reivindicaciones 5 a 8, que adicionalmente comprende:
- seleccionar un calzado predeterminado para el usuario basándose en el tipo de uñas del usuario;
 - seguimiento de tratamientos de ortonixias por monitorización del grosor de la lámina ungueal (120) y curvatura de la uña.

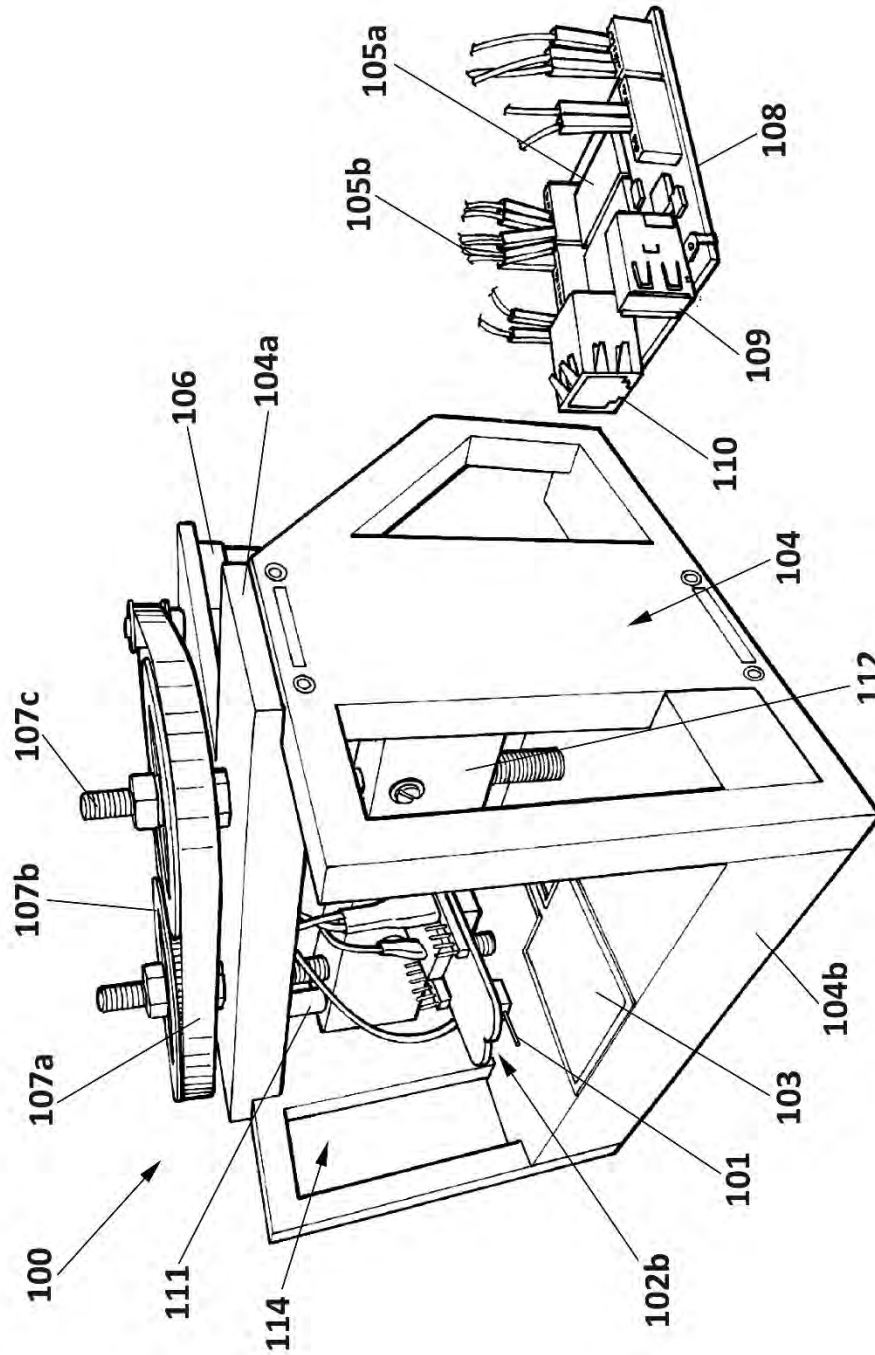
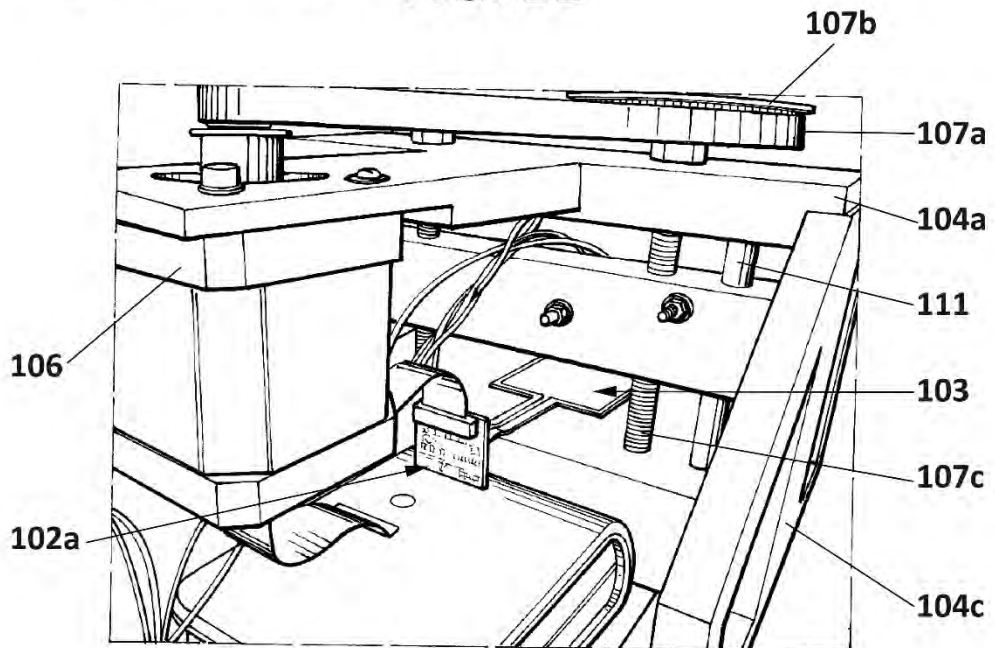
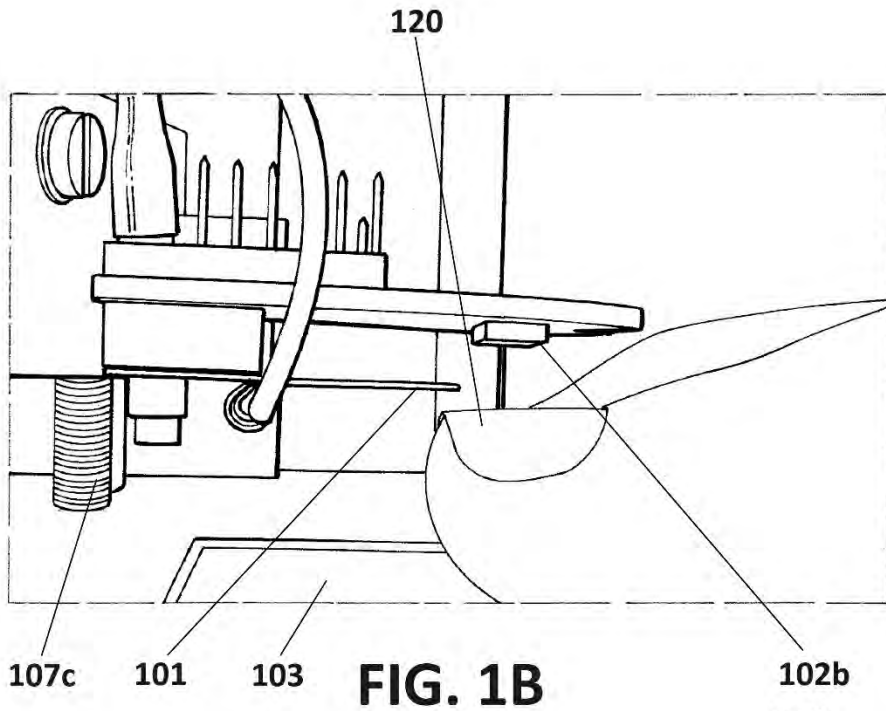


FIG. 1A

ES 2 784 799 B2



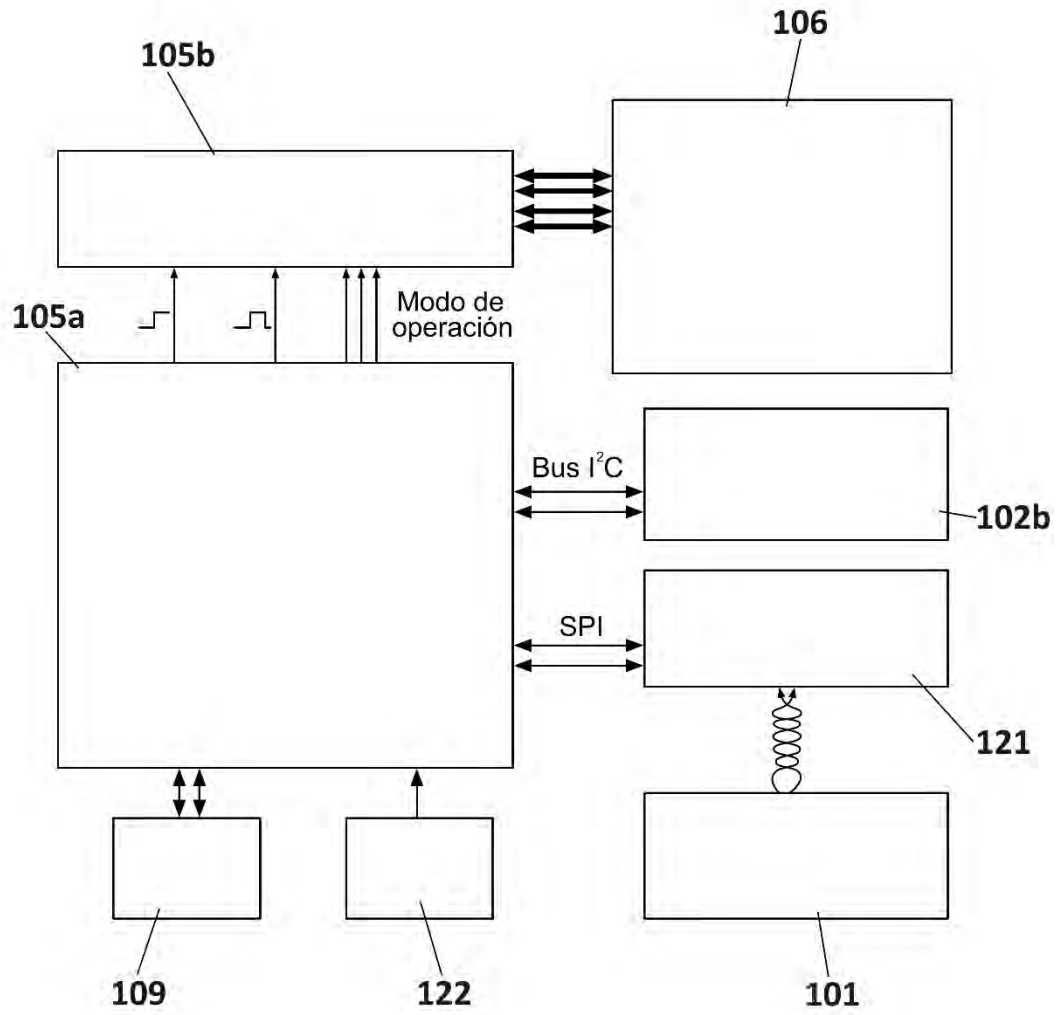


FIG. 2

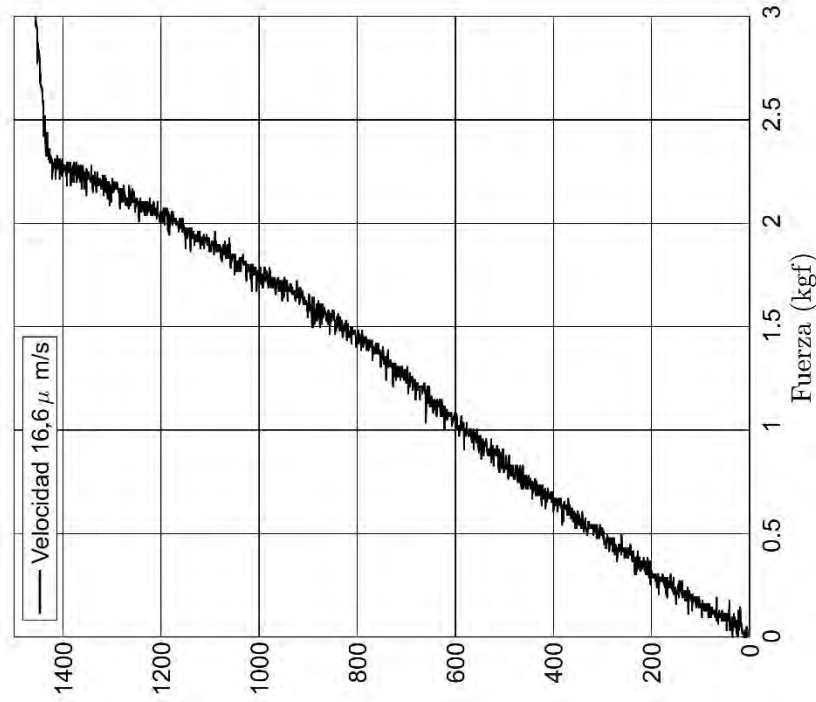


FIG. 3B

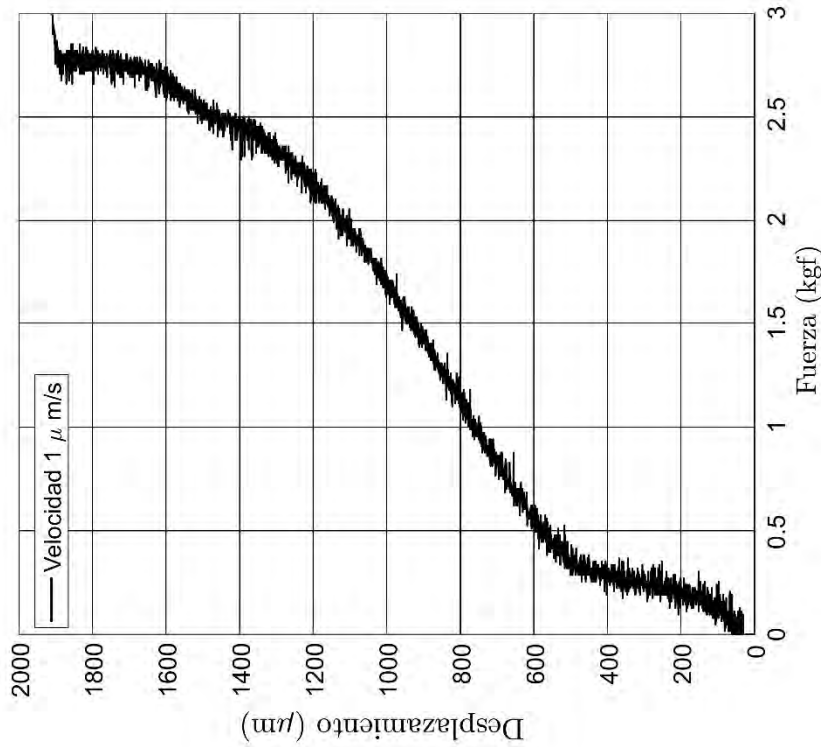


FIG. 3A

ES 2 784 799 B2

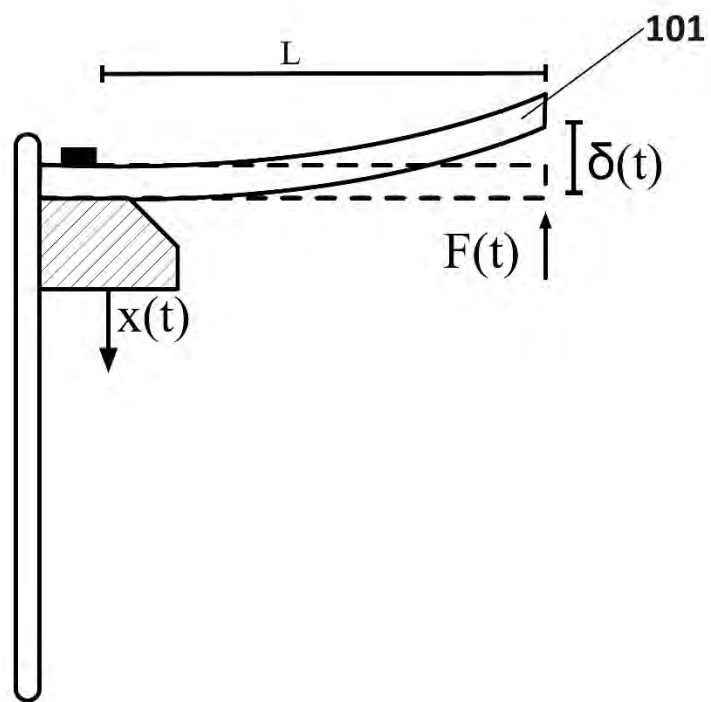


FIG. 4

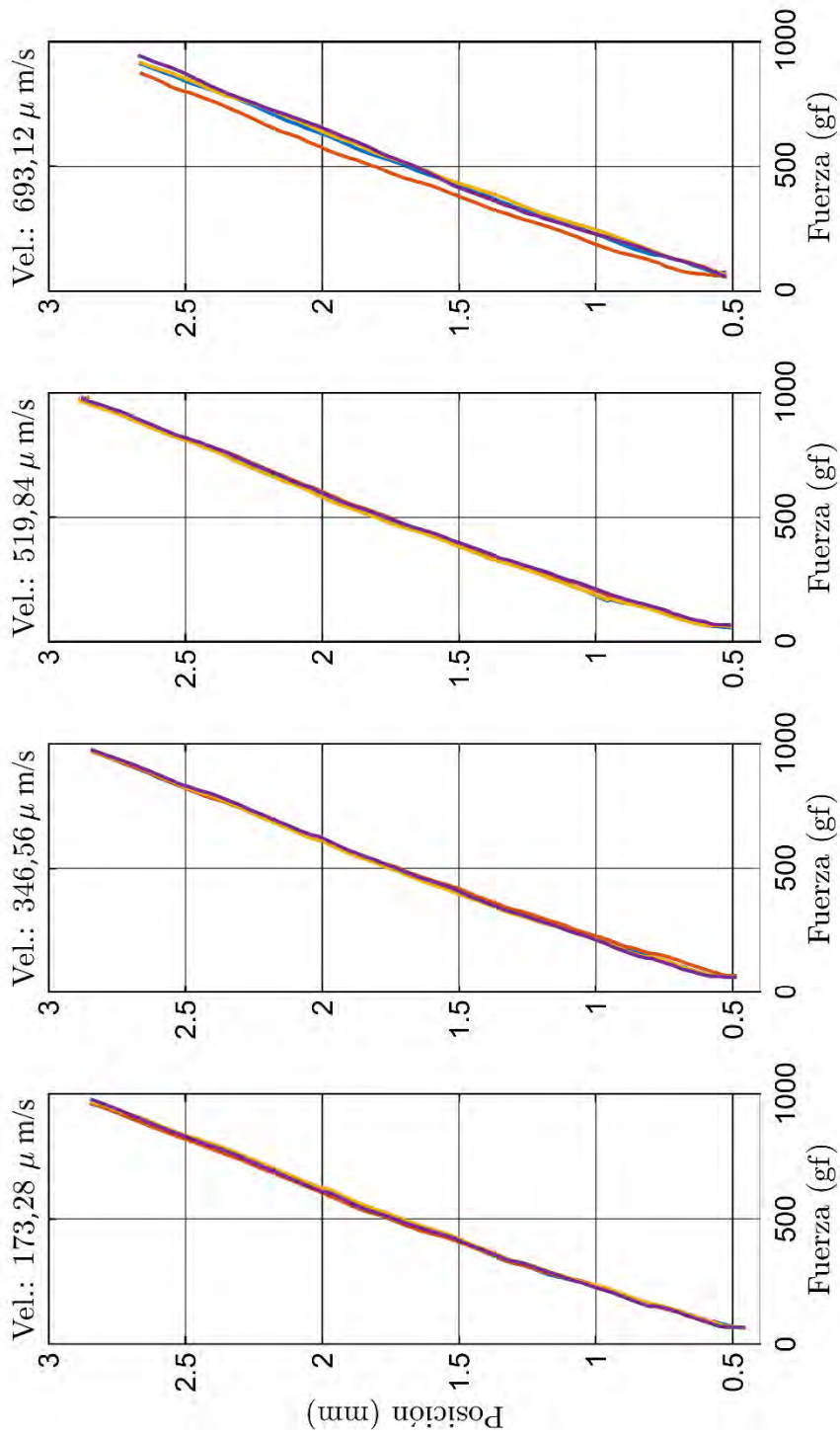


FIG. 5A

FIG. 5B

FIG. 5C

FIG. 5D

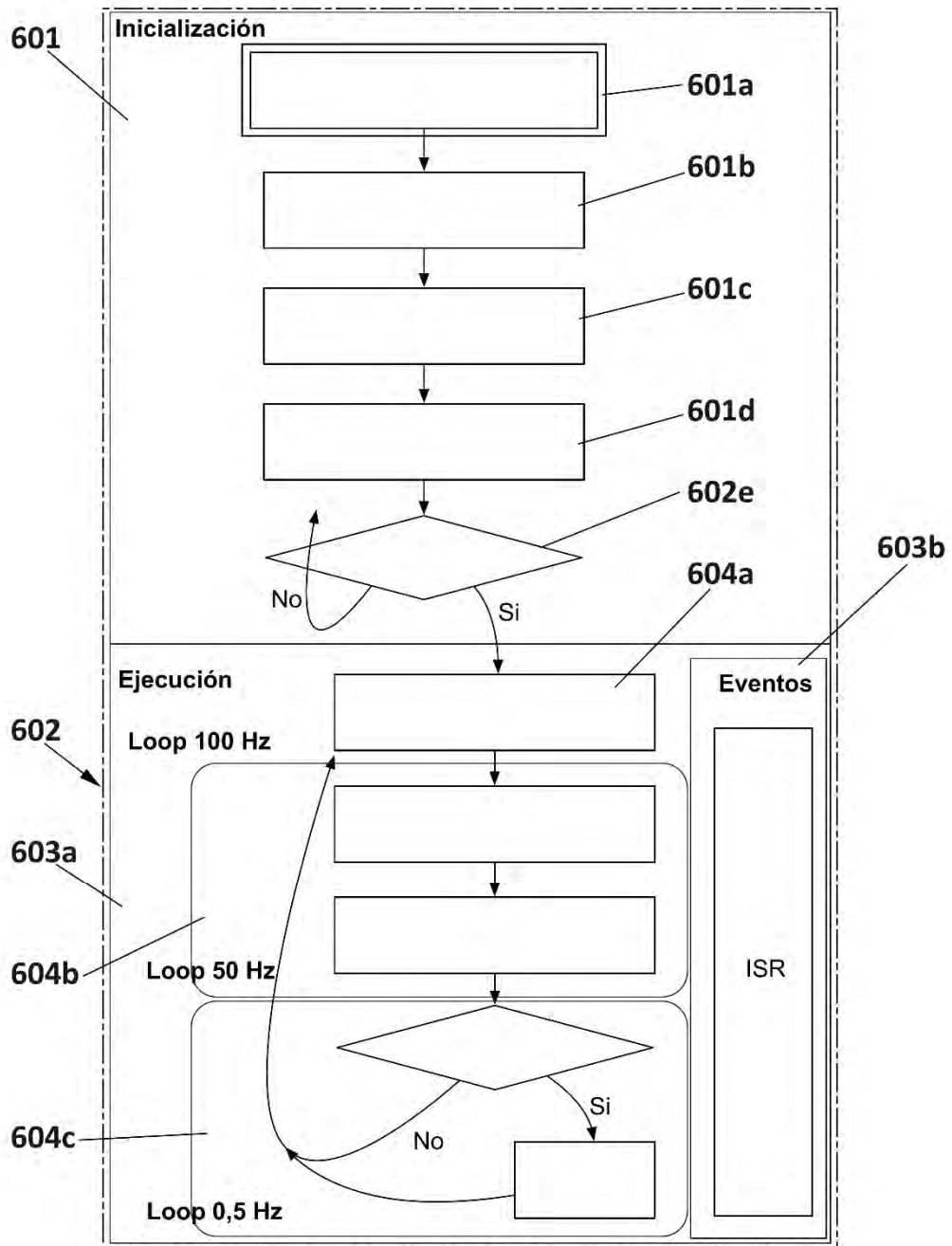


FIG. 6

ES 2 784 799 B2

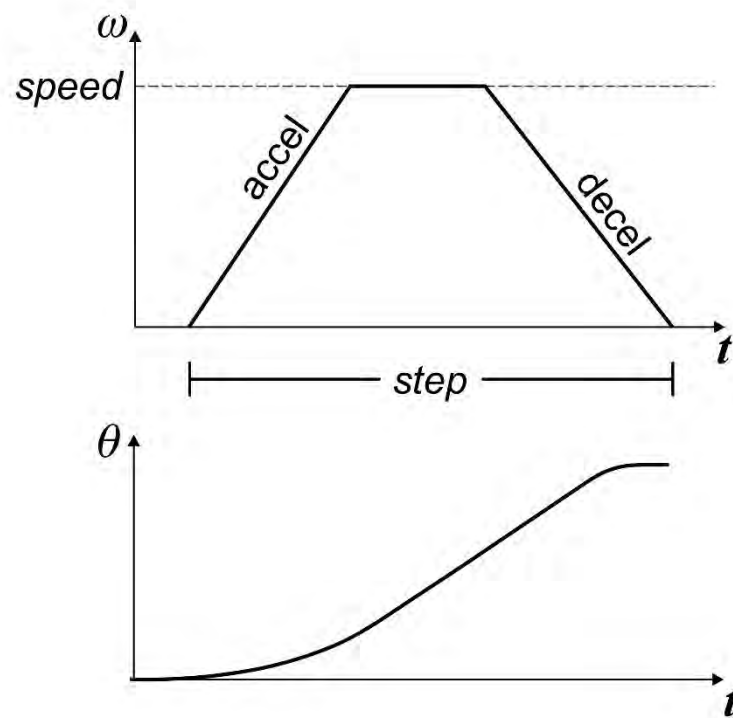


FIG. 7

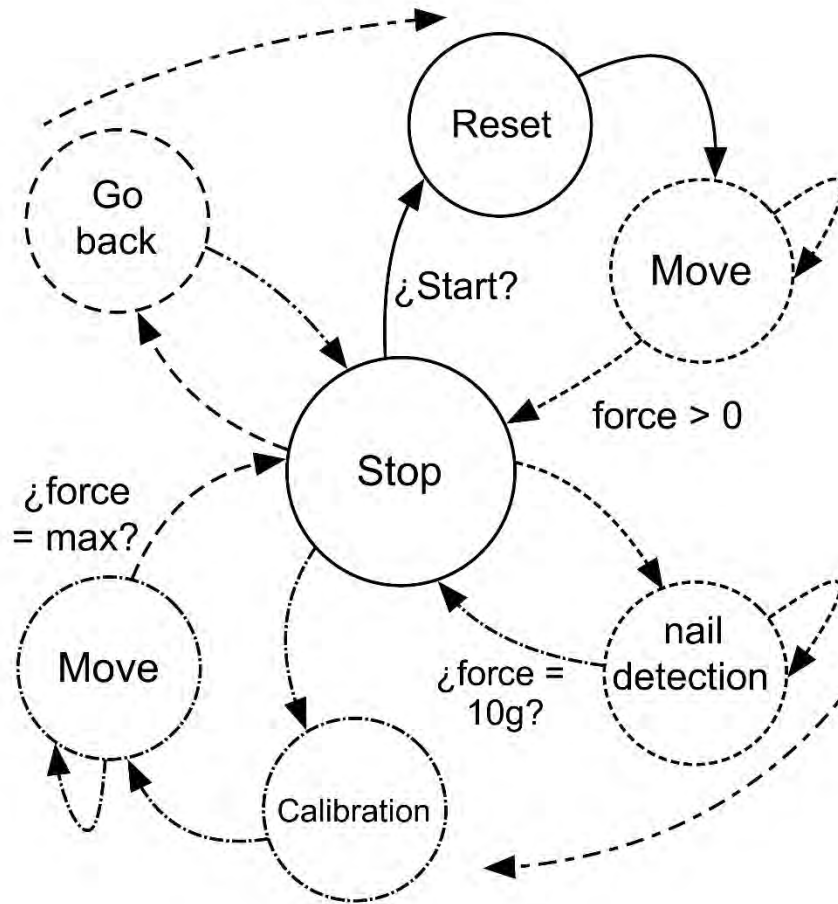


FIG. 8

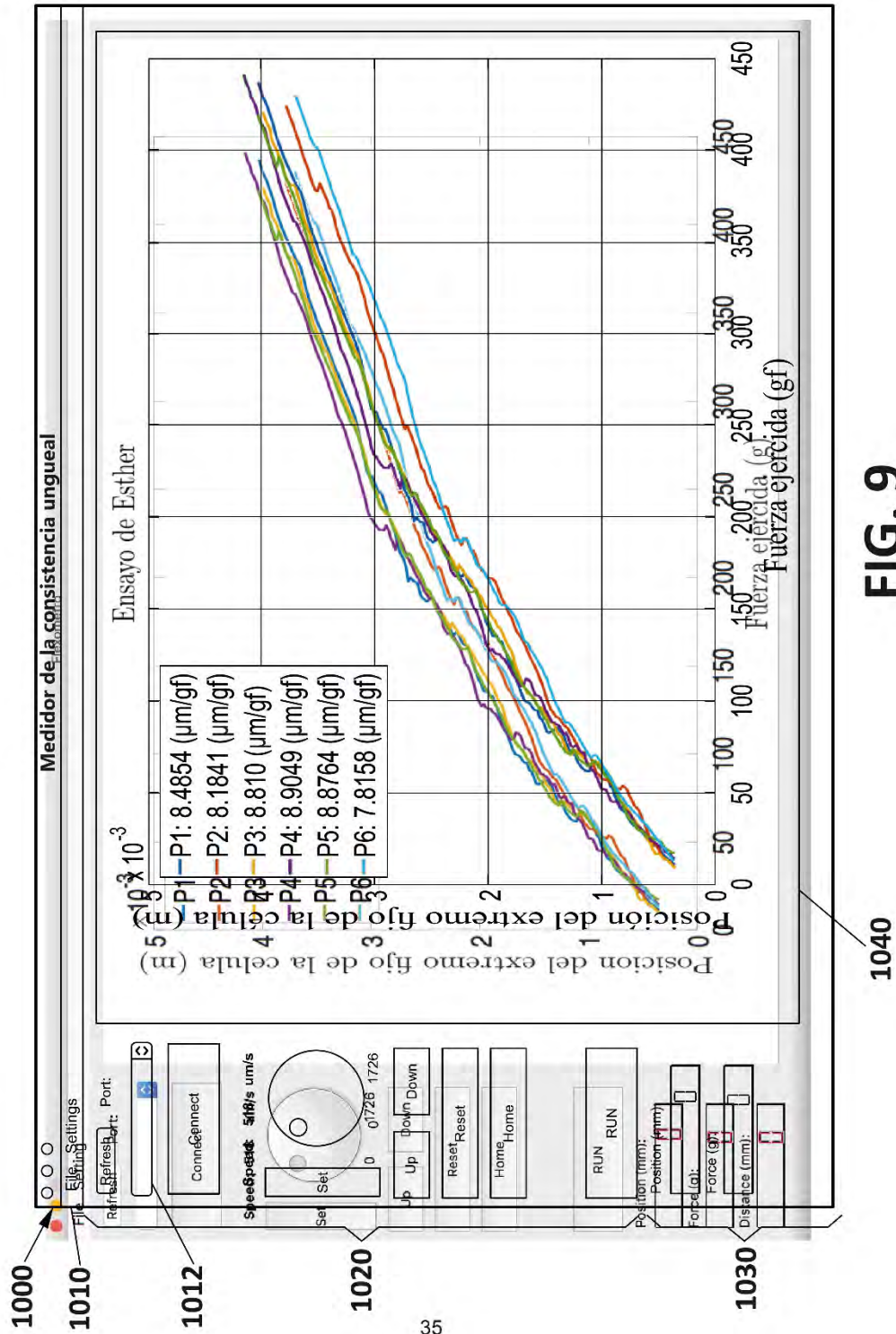


FIG. 9