

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA



TESIS DOCTORAL

Nuevas Técnicas para el Diagnóstico y Tratamiento de Alteraciones Ungueales

Félix Marcos Tejedor

DEPARTAMENTO DE TERAPÉUTICA MÉDICO-QUIRÚRGICA
UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

2017

Tesis Doctoral

Nuevas Técnicas para el Diagnóstico y Tratamiento de Alteraciones Ungueales

Felix Marcos Tejedor

Departamento de Terapéutica Médico-quirúrgica

2017



Modelo1

Asunto: Rtdo. Impreso de
Conformidad Defensa Tesis para su
Conocimiento y Difusión

Destinatario: Sr. Director de
Departamento

Como Directoras de la Tesis doctoral titulada: “**Nuevas Técnicas para el Diagnóstico y Tratamiento de Alteraciones Ungueales**”, realizada por **D. Félix Marcos Tejedor**, de la cual se adjuntan dos ejemplares encuadernados, un ejemplar en formato digital (junto con el resumen en castellano, si procede) y el documento de actividades, para el cumplimiento de lo establecido en el artículo 141.1 de los Estatutos de la Universidad de Extremadura.

INFORMAMOS

al **Consejo de Departamento** que la elaboración de la Tesis ha concluido y que la misma cumple con los criterios de calidad necesarios para que el doctorando pueda optar al Título de Doctor, por lo que:

SOLICITAMOS

del Consejo de Departamento que otorgue su conformidad para la presentación de la Tesis a la Comisión de Doctorado.

En Cáceres, a 20 de Diciembre de 2016

Fdo: Dra. María José Iglesias Sánchez y Dra. Raquel Mayordomo Acevedo.

"El poeta, artista o científico verdadero no se adelanta nunca a su época; su futuro es su época. Lo que ocurre es que los que le rodean, que no han llegado a ella ni a él, son actuales del pasado"

Juan Ramón Jiménez.

Agradecimientos.

Cada etapa que termina se asemeja a un viaje que se prepara y se disfruta con ilusión, cariño, angustia y ansias, todo ello a partes iguales. Este viaje que ha dado fruto a una etapa de mi vida de mucho trabajo y esfuerzo, no solo mío, sino también de otras muchas personas que se encontraban a mi alrededor en esta aventura y que con su apoyo, consejos o simplemente, por quedarse a mi lado, han hecho posible que llegara a destino.

Cualquier viaje, por pequeño que este sea, tiene un inicio, una preparación, una chispa inicial, sin la cual nada es posible. Como la vida misma, esa chispa, esos primeros pasos han venido de la mano de mi familia: mis padres y mis hermanas. Gracias por aguantar mis momentos de estrés y apoyarme en cada escala de este viaje. Y, como cuando coges un avión, despegas y alcanzas las nubes, he de agradecer a esas cuatro estrellas que velan por mí desde ahí arriba, no os olvido. De igual forma, a toda mi familia, el puerto seguro al que siempre vuelvo, las luces que me guían cuando aterrizo después de cada viaje.

Llegar a destino disfrutando del vuelo depende en gran medida de los comandantes que dirigen y controlan el avión. En este caso a M^a José y Raquel, que apostaron por mí y me defienden a capa y espada. Espero no haberos defraudado. Muchas gracias al grupo de investigación DEDAP, mi equipo. En especial, a Ana, por su apoyo, y a Sergio -mi compañero, como él me llama- por esas horas de psico-gesto-asesoría.

Todo viaje tiene escalas y este, desde luego, ha sido uno con muchas de ellas, pero con una en especial que me ha enriquecido como persona y como profesional. Las escalas pueden llegar a ser un tedio, un paso obligatorio que se hace pesado, aburrido y eterno. Para mí, esta escala ha resultado una experiencia inolvidable. Y ha sido gracias a la profesora Teresa y a todos los miembros de su grupo de investigación que me aceptaron en su laboratorio, me acogieron y me hicieron sentir como en casa. En especial, agradecer su implicación a Marta Mota, mi maestra, amiga, compañera y profesora en mi escala portuguesa. «Uma vez MMYRG, para sempre saudade»

¿Qué sería de los viajes sin personas con las que vivirlos y disfrutarlos? Son las personas con las que los compartes los que hacen que sean únicos y se estrechen lazos casi imposibles de romper. Son, en definitiva, los amigos, los que me han apoyado, han puesto sus esperanzas en mí y me han dado la fuerza necesaria en mis momentos de flaqueza. Todos habéis aportado un granito de arena en todos los ámbitos de este largo viaje a fondo perdido. Muchos de

vosotros, además, no sois conscientes de ello. Muchas gracias a todos y, en especial, a mis confesores Ángel y Begoña, por estar siempre ahí.

En todos los viajes encuentras a personas que forman parte de él, directa o indirectamente, como los auxiliares de vuelo, revisores, la seguridad del aeropuerto, personal de la aerolínea en tierra o incluso tus compañeros de asiento, que te lo hacen más ameno, fácil y cómodo, siempre dispuestos a que sea lo más agradable posible y arrimar el hombro cuando las cosas se ponen difíciles. Gracias, por tanto, al personal de servicios del Centro Universitario de Plasencia y, en concreto, al servicio de biblioteca (Marta, Amor y Sofía) y a Marta Company por vuestro trato y participación activa en este trabajo. A Luis Encinas, por tu soporte técnico y asesoramiento desinteresado en los momentos de crisis informáticas. Y a mis compañeros del Grado de Podología, por acogerme como uno más.

Los medios técnicos y humanos necesarios para preparar un viaje de gran envergadura hacen posible y facilitan que podamos realizar nuestros sueños, afrontándolos con una sonrisa y una mirada llena de ilusión. Sin ellos, todo sería mucho más complejo, a veces imposible. Muy agradecido a Eva Luengo, Cristina Muñoz, Manuela Hernández, Rosa Ana González y su grupo de investigación "Neurodegeneración. Mecanismos moleculares y modos de protección", la Podoclínica Gallego Marcos y la Clínica Podológica de la Universidad de Extremadura, por prestarme sus instalaciones y equipos para poder llevar a cabo este trabajo.

Por último, sé que en todos los viajes y en la preparación de los mismos, siempre o la mayoría de las veces hay algo que se nos olvida o que no podemos llevar. En este caso, alguien que se nos olvida. En definitiva, muchas gracias a todos los que, de una forma u otra (y que no puedo nombrar por no extenderme en demasía) habéis colaborado en este viaje, en todo su proceso de elaboración y desarrollo, cuyo destino final es esta tesis doctoral. Gracias.

Índice de contenidos.

I.	Resumen.....	1
1.	Resumen.....	3
2.	Abstract.....	4
II.	Introducción.....	5
1.	El aparato Ungueal.....	7
	Anatomía.....	7
	Vascularización e inervación.....	8
	Embriología.....	9
	Fisiología.....	10
	Funciones.....	12
	Composición de la uña.....	12
	Propiedades.....	14
2.	Alteraciones de la uñas.....	14
	Signos clínicos de la patología ungueal.....	15
	Principales patologías causantes de las alteraciones ungueales.....	18
	Cambios ungueales producidos por la edad.....	25
3.	Manejo de las onicopatías: Micosis y Psoriasis.....	26
	Historia clínica y exploración ungueal.....	26
	Diagnóstico.....	30
	Valoración de las patologías ungueales.....	31
	Tratamientos.....	33
	Importancia y comorbilidades de la patología ungueal.....	39
III.	Objetivos.....	41
1.	Objetivo principal.....	43
2.	Objetivos secundarios.....	43
IV.	Preámbulo.....	45

V.	Diagnóstico de las alteraciones ungueales: Micosis y Psoriasis. Propuestas para su mejora.....	49
1.	Diagnóstico de onicomicosis mediante PCR.....	51
	Estado actual del tema.....	51
	Introducción a la PCR.	52
	Puesta en marcha el uso de la PCR para la detección directa de Hongos dermatofitos en las uñas.....	55
	Puesta a punto de una PCR para mejorar la detección directa de Hongos en las uñas y de Hongos no dermatofitos.....	61
2.	Diagnóstico de la Psoriasis ungueal mediante técnicas de inmunoensayo.....	69
	Cuantificación de β -Defensina 2 plasmáticas para la detección de la Psoriasis ungueal ...	69
VI.	Tratamiento láser de las alteraciones ungueales de origen micótico e idiopático. Estudio de la eficacia.....	77
1.	Introducción al tratamiento láser.	79
2.	Aplicación del láser Nd:YAG 1064nm en alteraciones ungueales.....	80
	Estudio de la eficacia del tratamiento láser en onicomicosis.....	80
	Estudio de la eficacia del tratamiento láser en alteraciones ungueales idiopáticas.....	93
VII.	Discusión global.	99
VIII.	Conclusiones globales.....	105
IX.	Bibliografía consultada.....	109

I. Resumen

1. Resumen.

Las alteraciones ungueales son uno de los motivos más frecuentes de consulta en la clínica podológica. En la actualidad, el diagnóstico se hace de forma empírica en base a signos y síntomas que son comunes a varias patologías. Las pruebas complementarias que pueden confirmar el diagnóstico son poco utilizadas debido a su baja sensibilidad, a que son invasivas, a su larga duración, o a su alto coste económico.

Se necesitan nuevas pruebas complementarias para mejorar el diagnóstico de estas patologías, y que sean fáciles de incorporar a la clínica podológica para poder llevar a cabo correctamente la elección del tratamiento más adecuado.

Por ello, nos planteamos la puesta en marcha de una técnica rápida y sensible, basada en la biología molecular, para confirmar el diagnóstico de la micosis ungueal, comparando los resultados con los del cultivo microbiológico tradicional que tarda tres semanas.

En segundo lugar, para el diagnóstico de la segunda patología ungueal más frecuente, la psoriasis ungueal, utilizamos una técnica ELISA para la cuantificación de beta-defensina 2 en plasma, péptido que se encuentra en niveles elevados en pacientes con psoriasis.

Por otra parte, los tratamientos que actualmente se utilizan en este campo, son de muy larga duración, lo que acarrea un alto índice de abandono por parte del paciente.

En este sentido, llevamos a cabo un ensayo clínico para medir la eficacia del tratamiento láser, ya que se trata de un método rápido y sencillo que mejoraría la adherencia al tratamiento por

parte del paciente.

2. Abstract.

Nail disorders are one of the most frequent reasons for visiting the podiatry clinic. Currently, the diagnosis is conducted in an empirical manner dependent on symptoms and signs which are common in several pathologies. The complementary tests, which could confirm the diagnosis, are seldom used due to their low sensibility, their invasive effect, their lengthy period of time involved, or their highly economic costs.

Other complementary tests are necessary in order to be more accurate with the diagnosis of these pathologies, as well as, they should be easy to be incorporated in the podiatry clinic to be able to carry out the choice of the most appropriate treatment correctly.

Firstly, we set out the development of a rapid and sensitive technique, based on molecular biology, to confirm the diagnosis of nail fungus, comparing the results with the traditional microbiological culture that takes three weeks.

Secondly, we diagnosed the second most frequent nail pathology, that it is nail psoriasis, by using the ELISA technique in order to quantify the beta-defensin 2 in plasma, a peptide which is found in elevated levels in patients with psoriasis

On the other hand, the treatments currently used in this field require a great deal of time. For this reason, they have a high rate of abandonment.

In this respect, we carried out a clinical trial to measure the effectiveness of the laser treatment since it is a quick and simple method which could improve the patients' adherence to the treatment

II. Introducción

1. El aparato Ungueal.

El aparato ungueal ha persistido en la evolución de la especie humana, adaptándose a las necesidades que los dedos han ido requiriendo en cada momento para desarrollar sus funciones ¹.

Esta adaptación facilita las actividades de la vida cotidiana del ser humano, que en muchas ocasiones se ven limitadas cuando el aparato ungueal sufre una alteración, llegando a producir dolor en ciertos estadios de la enfermedad ^{2 3 4}.

Por este motivo las personas que sufren patologías ungueales acuden a los profesionales de ciencias de la salud demandando soluciones.

La lámina ungueal, comúnmente llamada uña, es el elemento visible del aparato ungueal y se localiza en el dorso distal de los dedos. Generalmente tiene una consistencia dura, forma biconcava y una superficie brillante y lisa ⁵.

Es una estructura permanente que está compuesta de células queratinizadas y compactadas originadas en la matriz ungueal ⁵, que es la región germinativa del aparato ungueal. Su eje longitudinal es de mayor tamaño que su eje transversal y con un grosor aproximadamente de 0.5 mm en las uñas de las manos y de 1 mm en las uñas de los pies ⁶.

Anatomía.

El aparato ungueal definitivo (figura 1) está formado por: la matriz que se localiza debajo del pliegue ungueal proximal (eponiquio) y es la encargada de mantener en constante crecimiento la placa ungueal, transformando las células indiferenciadas en células ungueales. Una pequeña perturbación en la matriz va a producir una alteración permanente de la uña. La lúnula es la parte visible de la matriz de color blanquecino y forma de media luna, que suele ser visible en el primer dedo por delante del eponiquio y raramente se observa en los dedos menores ^{6 7}.

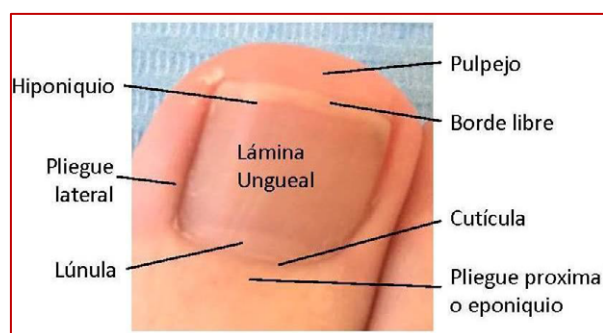


Figura 1. Anatomía del aparato ungueal.

El pliegue ungueal proximal o eponiquio recubre la matriz. Cualquier alteración en él puede hacer que cambie la dirección de crecimiento y producir cambios en el aspecto de la lámina ^{8 9}.

La lámina ungueal se apoya sobre el lecho ungueal, epitelio extremadamente fino que empieza en el borde más distal de la lúnula y termina en el hiponiquio. El hiponiquio es la unión entre el lecho y la cresta cutánea y se localiza bajo el borde libre de la uña. Su principal cometido es sellar el lecho para evitar la invasión de agentes externos ^{7 8}. En la superficie del pliegue ungueal se observan numerosas crestas longitudinales, que facilitan la adhesión con la lámina. Si se produce una avulsión de la lámina, el lecho se queratiniza ^{5 6 7}.

La cutícula es un epitelio queratinizado de estrato córneo modificado producido por el borde ungueal proximal o eponiquio adherido a la lámina, dando una protección e impidiendo la invasión de agentes externos ^{5 6 7 8}.

En el aparato ungueal encontramos además del eponiquio otros dos pliegues o rodetes laterales, con cierta continuidad entre los tres pliegues nombrados. Entre el pliegue ungueal proximal y los dos laterales llegan a cubrir el 75% de la periferia de la lámina. La principal función de los mismos es proteger al dedo mediante el sellado de la invasión de agentes externos⁷. También tienen continuidad con el hiponiquio cerrando así anteriormente el perímetro ungueal que protege a toda la lámina.

Vascularización e inervación.

El dedo posee un gran aporte sanguíneo a través de las arterias digitales, teniendo una gran importancia en el buen funcionamiento ya que la mala circulación puede producir alteraciones en el aparato ungueal ⁷.

Las arterias digitales transcurren a ambos lados de los dedos. A nivel del pliegue proximal se anastomosan. De estas arterias parten dos arcos capilares uno hacia la matriz y otro hacia el lecho. Con la ayuda de una lupa o dermatoscopio podemos llegar a visualizar la red de capilares, que son los encargados de dar el color rosáceo a la uña. Por otro lado, el retorno venoso se lleva a cabo a nivel dorsal mediante las venas colaterales que derivan de las venas metatarsianas y que forman un círculo venoso a nivel de la articulación interfalángica proximal, con una anastomosis proximal y otra distal con ramas transversas ^{5 10}.

Respecto a la inervación del aparato ungueal existen pocos trabajos que la describan. Pero si describen terminaciones nerviosas dispersas y algunos corpúsculos de Vater-Pacini (sensación vibratoria intensa y profunda) y de Meissner (tacto ligero o vibración leve) ¹⁰. Otorgándole de

esta forma la inervación del aparato ungueal a las ramas dorsales y plantares de los nervios digitales que acompañan a las arterias digitales ^{5 6 7}.

Existe inervación dorsal y plantar digital a cargo de diferentes nervios, que a su vez inervan diferentes zonas que podemos observar esquemáticamente en la tabla 1 ¹⁰.

Nervios Dorsales	Inervación
Nervio Peroneo Profundo	Cara lateral del primer dedo. Cara medial del segundo dedo
Nervio cutáneo dorsal medial	Cara medial del primer dedo. Cara lateral del segundo dedo. Cara medial del tercer dedo.
Nervio cutáneo dorsal intermedio	Cara lateral del tercer dedo. Cuarto dedo. Cara medial del quinto dedo.
Nervio cutáneo dorsal lateral	Cara lateral del quinto dedo.
Nervios Plantares	
Nervio digital plantar propio	Primer dedo. Cara medial del segundo dedo.
Nervios digitales plantares	Cara lateral del segundo dedo. Tercer dedo. Cara medial del cuarto dedo.
Rama superficial del Nervio plantar lateral	Cara lateral del cuarto dedo. Quinto dedo,

Tabla 1. Inervación digital.

Embriología.

Los primeros esbozos del aparato ungueal se ven a partir de la semana 9 de gestación en el dorso distal de los dedos, que crece de forma oblicua de distal a proximal y da lugar a una falsa uña o campo ungueal. En la semana 13 de desarrollo, el campo ungueal ya está bien definido y la matriz ya es capaz de producir la uña, pero no es visible bajo el pliegue proximal hasta la semana 14. En la semana 17 la uña ya cubre casi todo el lecho y a partir de la semana 20 crece en conjunto con el dedo. Cuando el individuo nace, la uña ya ha crecido hasta el pliegue ungueal distal ^{5 6 11 12 13}.

Fisiología.

La uña está en constante crecimiento. Este crecimiento es limitado por los pliegues y la falange ¹³, creciendo alrededor de 3mm/mes en uña normal. Tras la avulsión de la uña, esta tardaría en crecer por completo entre 6 - 8 meses en el caso de las manos y entre 12 - 18 meses e incluso más en las de los pies. Entre los 10 y los 14 años la uña alcanza su mayor velocidad de crecimiento y empieza a disminuir después de la segunda década de la vida ^{6 14}.

En la literatura podemos encontrar cuatro teorías sobre la formación biológica de la lámina ungueal:

Teoría clásica.

Esta teoría describe que la formación de la lámina ungueal es sólo dependiente de la matriz ungueal ^{10 15}.

Teoría de Jonhson.

En contra de lo que describe la teoría clásica, esta teoría defiende que al menos un 20% de la lámina ungueal procede de las células del lecho ungueal, dando una explicación del aumento de grosor y densidad la lámina según va creciendo la misma ^{10 15}.

Teoría de Lewis.

Se basa en que se producen material queratinocítico en el lecho ungueal en algunas alteraciones de la lámina ungueal. Por lo que se postula que la formación ungueal procede de tres partes. La parte más dorsal y la parte intermedia de la lámina serían fabricadas por la matriz, mientras que la porción más ventral de la misma será formada por el lecho ungueal, en la porción más proximal a la lúnula ^{10 15}.

Teoría de Pinkus.

Esta teoría defiende que el lecho ungueal está dividido en tres partes: una primera parte formada por la lúnula que sería encargada de formar la uña, una segunda parte que no fabricaría uña e iría desde la lúnula hasta el hiponiquio y una tercera parte que estaría formada por el hiponiquio y también estaría comprometida en la formación de la misma ^{10 15}.

Asumimos que en condiciones normales la uña estaría formada mayoritariamente por la matriz. Sin embargo en otras condiciones patológicas o traumáticas como sería el caso de una avulsión de la uña, podemos observar proliferación queratinocítica en el lecho. Así mismo en

ciertas patologías que cursan con hiperqueratosis subungueal distal, como es el caso de la psoriasis, la lámina sería generada por el hiponiquio ¹⁵.

Además de las teorías de la formación de la lámina ungueal, existen factores intrínsecos y extrínsecos que afectan al curso normal de crecimiento, y estos son los que se relacionan a continuación ^{5 6 11}.

Factores que aceleran el crecimiento	Factores que disminuyen el crecimiento
<p>Juventud</p> <p>Mano dominante</p> <p>Onicofagia</p> <p>Cortarse las uñas muy cortas</p> <p>ser hombre</p> <p>Durante la gestación</p> <p>Clima cálido</p> <p>Durante el día</p> <p>Verano</p> <p>Premenstruación</p>	<p>Malnutrición</p> <p>Durante la lactancia</p> <p>Clima frío</p> <p>Invierno</p> <p>Tratamiento con algunos fármacos</p> <p>Edad avanzada</p> <p>Ser Mujer</p> <p>Inmovilizaciones</p> <p>Durante la noche</p>

Tabla 2. Factores que influyen en el crecimiento de la lámina ungueal.

Por otro lado, existen situaciones patológicas en las que se alteran el crecimiento natural de la uña ¹¹.

Patologías que aceleran el crecimiento	Patologías que disminuyen el crecimiento
<p>Psoriasis</p> <p>Pitiriasis ruba pilar</p> <p>Hiperqueratosis epidermolítica</p> <p>Onicolisis idiopática en mujeres</p> <p>Hipertiroidismo</p> <p>Hiperpituitarismo</p> <p>Síndrome de las uñas quebradizas</p> <p>Etretinato</p> <p>Calcio</p> <p>Vit D</p> <p>Biotina</p> <p>Cisteína</p> <p>Benoxaprofeno</p> <p>Anticonceptivos</p> <p>Antimicóticos</p>	<p>Síndrome uñas amarillas</p> <p>Liquen plano</p> <p>Policondritis recidivante</p> <p>Onicomycosis</p> <p>Enfermedades crónicas</p> <p>Infecciones agudas con fiebre</p> <p>Fumadores</p> <p>Hipotiroidismo</p> <p>Parálisis</p> <p>Neuropatía periférica</p> <p>Insuficiencia cardiaca</p> <p>Azatioprina</p> <p>Oro</p> <p>Litio</p> <p>Sulfonamidas</p>

Tabla 3. Patologías que influyen en el crecimiento de la lámina ungueal.

Funciones.

Al aparato ungueal se le atribuye una función mayoritariamente protectora (sobre todo protege las anastomosis venosas de posibles microtraumatismos constantes) y de defensa del extremo distal de los dedos^{16 17}.

Además la uña desempeña otras funciones como: posibilidad de rascar (sobre todo en las uñas de las manos), posibilidad de pinzar, actuar como órganos sensores (aumentan la precisión y la sensibilidad táctil de los extremos de los dedos) y biomecánica (favorecen la estabilidad del apoyo digital, y a su vez la deambulación) ^{16 17}.

Sin embargo, no podemos obviar la importancia estética que ha tomado la uña en la sociedad actual ^{16 17}.

Composición de la uña.

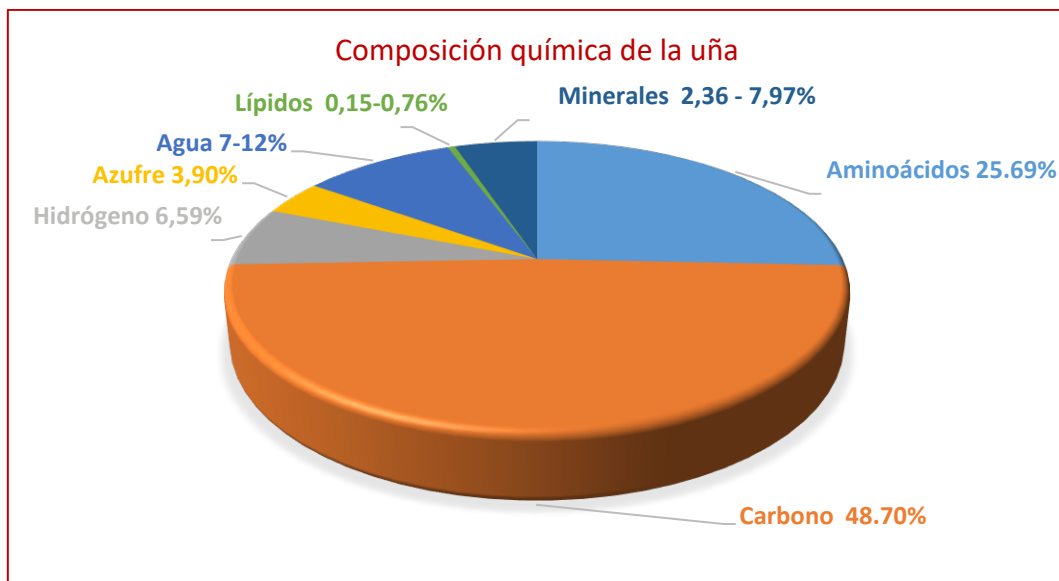


Figura 2. Representación gráfica de la composición química de la uña. Extraído y adaptado de Hidalgo Ruiz S. Clasificación de las patologías ungueales: Estadística de la clínica podológica de la UB. Rev española Podol. 1999;10(7):349-408.

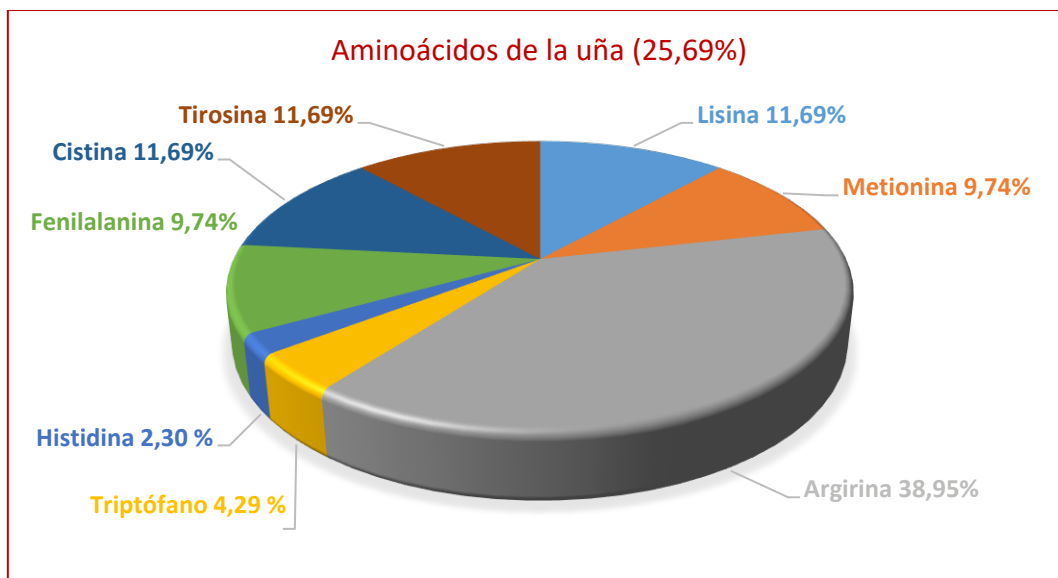


Figura 3. Representación gráfica de las proporciones de aminoácidos presentes en la uña. Extraído y adaptado de Hidalgo Ruiz S. Clasificación de las patologías ungueales: Estadística de la clínica podológica de la UB. Rev española Podol. 1999;10(7):349-408.

Relación de minerales que podemos encontrar en la lámina ungueal:

Fósforo
Calcio
Cinc
Magnesio
Cobre
Hierro
Sílice
Plomo
Plata
Aluminio

Tabla 4. Minerales presentes en la lámina ungueal. Extraído y adaptado de Hidalgo Ruiz S. Clasificación de las patologías ungueales: Estadística de la clínica podológica de la UB. Rev española Podol. 1999;10(7):349-408.

Propiedades.

Fuerza.

Esta propiedad viene otorgada por el diseño estructural de su forma bicóncava y la composición de la uña. Que le da una cierta flexibilidad y rigidez, proporcionada principalmente por la cara ventral la lámina ⁵.

Permeabilidad.

La permeabilidad de la uña es muy importante a la hora del tratamiento farmacológico, porque de ella depende su absorción. Una uña hidratada, sana y que tiene una estrecha relación con el lecho es mucho más permeable al agua que al alcohol, comportándose como un hidrogel con los alcoholes polares y semipolares de alta fuerza iónica. Por lo que penetrara mejor la uñas aquellos fármacos que sus principios activos son solubles en agua y de poco peso molecular ⁵.

Penetración de la radiación.

La penetración de radiaciones en la uña tiene tanto ventajas como inconvenientes. Está demostrado que el tratamiento con fototerapia y con PUVA (tratamiento que combina la aplicación de un psoralen y la exposición a los UVA) supone beneficios en los tejidos subungueales. Sin embargo existen otro tipo de radiaciones, como es el caso de los RX ocupacionales que producen carcinomas *in situ* ¹¹.

2. Alteraciones de la uñas.

Las alteraciones fueron descritas por primera vez por Hipócrates en el Siglo V a.C y posteriormente fueron asociadas como signos de enfermedades sistémicas y/o adquiridas. Y en la actualidad, podemos encontrar descritos multitud de alteraciones ungueales ¹⁸.

A pesar de que su prevalencia siempre ha sido alta y eran consideradas hasta hace poco tiempo como irrelevantes. Esta consideración, tanto por parte de la sociedad como por el colectivo facultativo, posiblemente fuera debido a que, dichas patologías, pasan la mayor parte del tiempo ocultas por el calzado. En la actualidad son uno de los principales motivos más frecuentes de consulta en la clínica de podología ^{2 8 19}. Probablemente también sea debido a que pueden llegar a producir un dolor que limita la actividad cotidiana del paciente, y al incremento que está experimentando la sociedad por el cuidado de la imagen, ya que las lesiones en las uñas están entre las patologías que mayor impacto psicosocial producen ^{2 3}.

Las principales patologías que cursan con alteración de la lámina ungueal son la onicomicosis con una incidencia del 50 %, seguida por la psoriasis, el liquen plano y los traumatismos, siendo muy complejo el diagnóstico diferencial clínico en estas patologías porque cursan con sintomatología común ^{4 20 21 22 23 24}.

Signos clínicos de la patología ungueal.

En la tabla 5 detallamos los principales signos clínicos con los que pueden cursar las diferentes patologías ungueales, clasificados por tipos de alteraciones ^{25 26}.

<p>Alteraciones de la presencia.</p> <ul style="list-style-type: none"> Anoniquia o Onicoptosis. Polioniquia Uña Ectópica u onicoheterotopia. Uñas duplicadas. 	<p>Alteraciones de Adherencia.</p> <ul style="list-style-type: none"> Defluvio ungueal. Fotoonicolísis. Onicolisis. Onicomadesis. Onicosquisis o uñas en orilla de mar. Pterigio.
<p>Alteraciones de tamaño.</p> <ul style="list-style-type: none"> Braquioniquia, uña corta o uña de raqueta. Doliconiquia. Hiponiquia. Macroniquia. Microniquias. Onicoatrofia. Uña circunferencial. 	<p>Alteraciones en el color (cromoniquia).</p> <ul style="list-style-type: none"> Leuconiquia. Cloroniquia. Xantoniquia. Eritroniquia longitudinal. Hemorragia en astilla o hematomas. Melanoniquia. Lúnula roja, azules o negras. Uñas de Terry. Manchas en aceite
<p>Alteraciones en la superficie.</p> <ul style="list-style-type: none"> Depresiones longitudinales. Elconixis. Estrías. Línea de Beau o depresiones transversas. Onicorrexis. Pitting o pits. Pterigio ungueal inverso. Traquioniquia. 	<p>Alteraciones respecto a las curvaturas.</p> <ul style="list-style-type: none"> Coiloniquia. Pinza. Involuta. Convoluta. Mal alineamiento ungueal Platoniquia. Uña en vidrio de reloj o hipocráticas. Uñas en pico de loro.
<p>Alteraciones de grosor.</p> <ul style="list-style-type: none"> Coloniquia. Hiperqueratosis subungueal Onicocauxis. Onicofosis. Onicogrifosis. Paquioniquia. 	<p>Alteraciones de la consistencia</p> <ul style="list-style-type: none"> Hapaloniquia. Oniclisis. Onicomalacia o Uñas blandas. Uñas duras. Uñas friables.

Alteraciones producidas por hábitos Onicofagia. Onicotilomania. Uñas bidet.	Alteraciones por agentes externos. Toxiconiquia. Uña encarnada o Onicocriptosis.
Alteraciones de la sensibilidad Onicalgia Onicodinia	Alteraciones por infecciones. Onicomycosis. Paroniquia o perionixis.

Tabla 5. Signos clínicos de la patología ungueal.

A continuación, describimos la terminología más utilizada, los signos y síntomas más frecuentes en las patologías de las uñas. Y en especial lo relacionado con las enfermedades tratadas en el presente trabajo.

Dermatofitoma: porción oncolítica de la uña de color amarillento producida por la infección de hongos ²⁷ (ver figura 4).

Detritus: material orgánico producido por infección micótica y que se acumula entre el lecho y la lámina ²⁸ (ver figura 4).

Hemorragias en astilla: pequeñas hemorragias que adoptan la forma de las crestas longitudinales del lecho de color marrón-rojizo, localizadas en el tercio distal del lecho ²⁹ (ver figura 4).

Hiperqueratosis subungueal: engrosamiento del lecho ungueal, normalmente en su tercio distal ²⁶ (ver figura 4).



Figura 4. En la imagen de la izquierda observamos un dermatofitoma con detritus. En la imagen del centro se observa hiperqueratosis subungueal y en la de la derecha hemorragias en astilla y Onicolisis.

Leuconiquia: es el color blanco de las uñas, nos referiremos a una leuconiquia verdadera cuando el color blanco es debido a la lámina y se denomina aparente si el color blanco es

debido a la coloración del lecho ungueal ²⁵. Su manifestación clínica puede ser total o parcial, en el caso de parcial puede cursar en forma de estrías (longitudinales o transversales) o punteada. Las estrías transversales reciben el nombre de **Líneas de Mees**, y a la unión de muchas líneas le denomina **Líneas de Muehrck**, formando una leuconiquia total ²⁶ (ver figura 5).



Figura 5. Leuconiquias verdaderas. De izquierda a derecha, total, longitudinal, líneas de Mees y líneas de Muehrck.

Lúnula roja: se describe así cuando la lúnula toma un color rojo ²⁶.

Manchas en aceite: manchas típicas de la psoriasis ungueal de color asalmonado ⁸ (figura 6).

Melanoniquia: cuando la uña adquiere un color oscuro o marrón ²⁵.

Onicolisis: desprendimiento de la lámina ungueal del propio lecho, comenzando su desprendimiento por la zona del hiponiquio y avanzando hacia la matriz. Lo podemos observar en psoriasis, onicomycosis y en traumatismos ²⁶ (ver figura 6).

Pits o pitting: es uno de los signos patognomónicos de la psoriasis ungueal que consiste en depresiones puntiformes ^{8 25} (ver figura 6).



Figura 6. De izquierda a derecha. En la primera imagen se observa Onicolisis, manchas en aceite y pequeñas hemorragias en astilla. En la segunda observamos pits. La siguiente imagen corresponde a una traquioniquia y en la última vemos una onicodistrofia total y xantoniquia.

Traquioniquia: superficie rugosa de la uña, de color mate y en ocasiones pequeños hoyuelos. También se puede conocer como uñas en papel de lija. Principalmente se observa en la distrofia de las 20 uñas ^{25 26} (ver figura 6).

Xantoniquia: color amarillo en la lámina ungueal ²⁵ (ver figura 6).

Principales patologías causantes de las alteraciones ungueales.

Micosis.

La micosis es la infección por dermatofitos, hongos no dermatofitos y en menor medida por levadura. Estos hongos son queratinófilos e infectan tejidos superficiales queratinizados (piel, pelo y uñas) de humanos y animales causando micosis cutáneas llamadas también dermatomicosis ^{4 23 30 31}.

El mecanismo de transmisión suele ser a través de fómites. Los hongos se adquieren a partir del medio ambiente en el que se encuentran como saprófitos, ya que la patogenicidad de estos hongos está más en relación con el huésped que con el propio agente etiológico. Existe un mayor incremento de infecciones micóticas en individuos en estado de inmunodepresión (aquellos sometidos a trasplantes de órganos, quimioterapia, corticoides, que sufren diabetes y/o sida), así como en ciertos estilos de vida (ser asiduo a piscinas, saunas, gimnasios) y la moda (zapatos oclusivos por ejemplo) ^{4 21 32}.

La onicomycosis es una infección universalizada y con una prevalencia muy heterogénea que oscila entre el 2.1% y el 29.6%, según las poblaciones estudiadas. Esto es debido a que existen factores tanto culturales, de hábitos sociales, climatológicos como el aumento de las tasas de prevalencias de otras patologías propensas a padecer estas infecciones, lo cual justifica que esta horquilla sea tan amplia. Los estudios revisados indican que la onicomycosis representa el 30 % de las infecciones superficiales por hongos. Respecto a la edad, en la población infantil existe prevalencia del 0-2.6 % (ver figura 7) y a medida que la edad aumenta también aumentan los porcentajes. Esta incidencia experimenta un mayor aumento pasando los 55 años y alcanzando un 48-60% en la población de más de 70 años. Según la localización, la prevalencia es mayor en las uñas de los pies que en las de las manos y afecta principalmente a la primera uña de cada pie ^{4 20 23 30 31}.

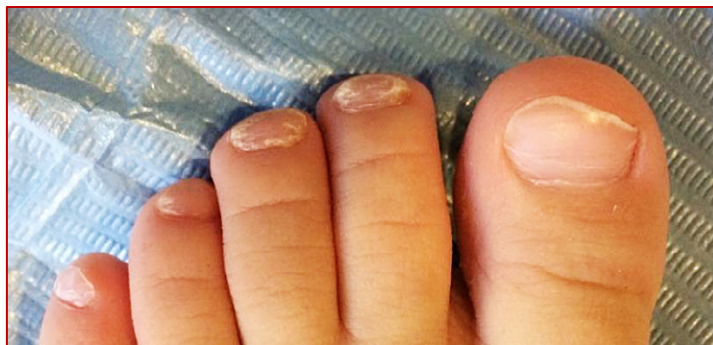


Figura 7. Observamos en la segunda y en la tercera uña Onicomycosis Blanca Superficial en edad infantil.

Las onicomycosis representan aproximadamente el 50% de las patologías ungueales, pero no debemos olvidar que además existen numerosas micosis ungueales secundarias asociadas a otras patologías. Es el caso de la Psoriasis ungueal, ya que en torno al 55-80% de la población que la sufre tienen infecciones secundarias por hongos ^{4 33}. Este dato debemos tenerlo en consideración ya que para poder resolver la onicopatía es necesario un tratamiento bidireccional ⁴.

Sintomatología

Los signos más frecuente con los que cursa la onicomycosis son: onicolisis, hiperqueratosis subungueal, detritus, decoloración (blanca, amarilla o marrón) y destrucción parcial o total de la lámina ungueal ^{20 30}.

Formas clínicas de las Onicomycosis.

Teniendo en cuenta la sintomatología, el agente causante y la vía de entrada, podemos clasificar las onicomycosis en cinco formas clínicas distintas:

Onicomycosis subungueal distal (OSD)

Es la manifestación clínica más frecuente que se localiza principalmente en la uña del dedo gordo. La infección suele ser por el *Trichophyton Rubrum*, y con menor frecuencia de otros dermatofitos. El hongo penetra a través del hiponiquio e invade la parte inferior de la uña, esta invasión avanza hacia la parte proximal de la misma. Si la infección evoluciona desde la porción distal y lateral de la uña hacia proximal recibe el nombre de Onicomycosis subungueal disto-lateral ²³.

Los signos que podemos observar son: abundante hiperqueratosis subungueal distal o disto-lateral, onicolisis y dermatofitomas. Con el paso del tiempo los dermatofitos hacen que la uña se vuelva opaca y mate. También podemos observar la formación de túneles de aire dentro de la lámina ungueal, fisurando de esta forma la uña y dando como resultado una uña frágil y quebradiza ²⁷ (ver figura 8).



Figura 8. Onicomycosis subungueales distales, en las que podemos observar los canales de aire y dermatofitomas típicos en esta forma clínica. Las dos imágenes de la derecha son OSD disto-laterales.

Onicomycosis subungueal proximal (OSP):

Mayoritariamente la infección es producida por el *T. Rubrum*, seguido por el *T. Mentagrophytes* y mohos. La invasión de estos es a través del pliegue proximal de la uña e invadiendo la matriz hasta llegar a la parte inferior de la lámina, avanzando la infección de proximal a distal. Suelen estar asociadas a pacientes inmunodeprimidos (siendo un marcador temprano de la infección por VIH) o son infecciones secundarias postraumáticas. Las manifestaciones clínicas son manchas blanquecinas en la parte proximal y subungueal de la uña que al fresar no desaparece fácilmente ²³ (ver figura 9).

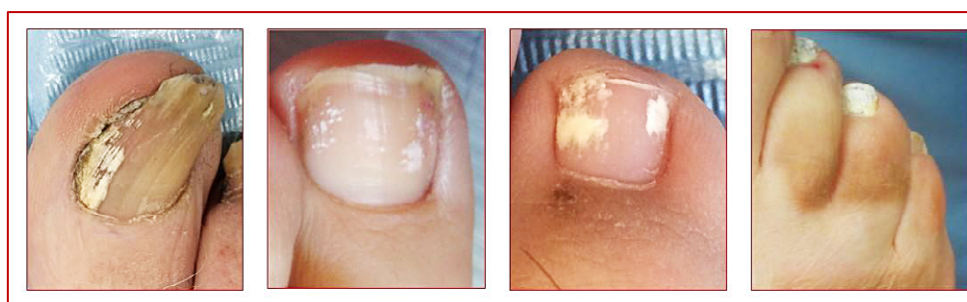


Figura 9. En la imagen de la derecha se observa una onicomycosis subungueal proximal. Mientras que en las otras tres podemos observar la forma clínica de onicomycosis blanca superficial.

Onicomicosis superficial blanca (OSB):

El agente infeccioso más común es el *T. Mentragrophytes*, en adultos y en edad pediátrica por *Candida albicans*. La invasión de la lámina es por la parte superficial de la lámina. La clínica que muestra la uña son manchas blancas con aspecto tizoso que se retiran fácilmente con el fresado ³⁴ (ver figura 9).

Onicomicosis distrófica total (ODT):

Normalmente es el estadio más avanzado de las formas clínicas de Onicomicosis descritas anteriormente, y con mayor incidencia en pacientes inmunodeprimidos. La uña presenta un engrosamiento de la lámina ungueal, el tejido periungueal inflamado, coloración amarillenta marronacea y onicolisis ^{23 27}(ver figura 10).



Figura 10. Onicomicosis distróficas totales.

Candidiasis ungueal (CU):

En este caso la onicomicosis es producida por Cándidas, habitualmente del género *Albicans*, *Parapsilosis* y *Tropicalis*.

La unidad ungueal presenta una lámina engrosada, inflamación en el pliegue ungueal proximal, matriz, lecho e hiponiquio, erosiones del borde distal o lateral de la lámina, además de hiperqueratosis en el lecho de la uña. Pero la paroniquia es el signo más característico ²⁷ (ver figura 11).



Figura 11. Candidiasis ungueal.

Psoriasis.

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica y recidivante de la piel, cuya alteración más evidente es la hiperproliferación y la aberrante diferenciación de los queratinocitos, que dan como resultados unas lesiones eritematosas descamativas (ver figura 12). Estas escamas son de color plateado y blanco nacarado, y con una afectación simétrica en el mayor número de los casos. Las manifestaciones suelen localizarse en el cuero cabelludo, articulaciones de las extremidades, región sacra y en los genitales externos, llegando a alcanzar una psoriasis generalizada en el caso que afecte a todo el tejido cutáneo. El síntoma más representativo de esta enfermedad es el picor ^{35 36 37}.

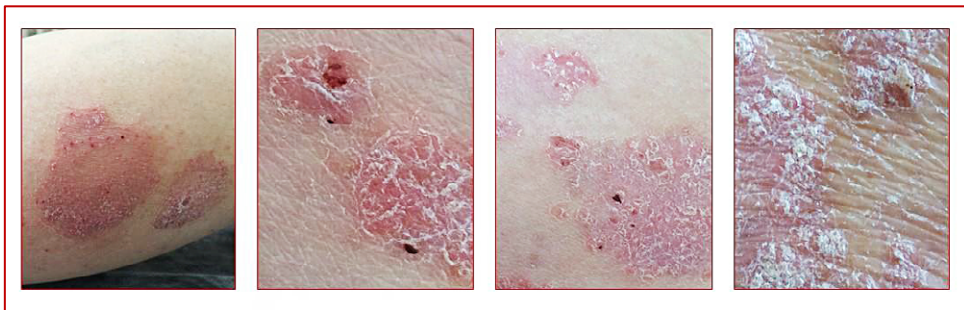


Figura 12. Lesiones eritematodescamativas típicas de la psoriasis.

Sin embargo la etiología de la enfermedad es una gran desconocida, pero se sabe que está determinada por factores ambientales, genéticos, inmunológicos, infecciosos, psicológicos, físicos, medicamentosos y alcohol ^{35 36}.

Esta dermatopatía tiene una prevalencia del 2-3% de la población mundial y se estima que el 0,4% de la población no está diagnosticada ³⁸. El debut puede manifestarse en cualquier edad, normalmente entre los 15-30 años, siendo poco frecuente en niños y sin existir diferencia de prevalencia según el sexo ^{37 39}. En la mayoría de los casos se produce tras la vivencia de un episodio o estado de estrés, o tras una rinofaringitis ³⁷. Además el 40% de los pacientes que desarrollan la enfermedad comparten enfermedad con más familiares. Y en torno al 25% de ellos manifiestan una intensidad de la enfermedad entre moderada y severa ^{40 41 42}.

Formas clínicas de la Psoriasis

Psoriasis vulgar o en placa	Es la manifestación clínica más común, presenta lesiones típicas de la enfermedad en codos, rodillas, cuero cabelludo y la zona lumbo-sacra.
Psoriasis guttata o en gotas	Afectación de pronostico bueno, en la que las lesiones son de tamaño menor a 1cm, incluso presentado pápulas, en tronco y extremidades. Debut relacionado tras infecciones de las vías respiratorias recientes.
Psoriasis invertida	Se caracteriza por tener menos descamación y manifestarse en los pliegues.
Psoriasis eritrodérmica:	Se le denomina así a los estadios muy avanzados de la enfermedad donde las lesiones ocupan más del 90% del área corporal.
Psoriasis Ungueal	Alteraciones del aparato ungueal producidas por la psoriasis. Las manifestaciones clínicas más comunes son pits, manchas en aceite, Onicolisis y hiperqueratosis subungueal.
Psoriasis Palmo-plantar	Es una forma crónica de la enfermedad en la que las lesiones se manifiestan en las palmas y en las plantas, con ausencia de pústulas, y presentando una aspecto mucho mas hiperqueratósico.
Psoriasis pustulosas	
Pustulosa palmo-plantar	Manifestación clínica de pústulas psoriásicas en las palmas y plantas, localizadas en el ALI que refieren dolor.
Acrodermatosis de Hallopeau	De mayor frecuencia en las falanges distales de las manos, por estar sometidas a mayor traumatismos. Y consiste en la aparición de pústulas que pueden llegar a comprometer a la matriz ungueal.
Pustulosa generalizada	Puede llegar a comprometer la vida del individuo por su aparición súbita y generalizada de pústulas tanto en zona sana como en zonas con lesiones previas.
Pustulosa infantil o juvenil	Manifestación de pronostico bueno, en la que aparecen pústulas por todo el área dérmico pero sin comprometer sistémicamente.

Tabla 6. Formas clínicas de la psoriasis. Extraído y adaptado de Gallo Gutiérrez E, Navarro Tejedor R. Psoriasis y patología eritematodescamativa. Med - Programa Form Médica Contin Acreditado. 2010;10(47):3131-3139. doi:10.1016/S0304-5412(10)70005-6.

Psoriasis Ungueal:

Estas malformaciones se manifiestan de forma crónica en el 50% de la población afectada por psoriasis, en el 90% de ellos en algún momento las han sufrido de forma aguda a lo largo de su vida, y es el único signo de la enfermedad en el 5-10% de los casos ^{8 40 43}.

En más del 80% de los casos la encontramos asociada a artritis psoriática, y en el 50% de los pacientes con psoriasis manifiestan dolor en el aparato ungueal. Este dolor llega a ser limitante para el individuo afectado (casi en el 60% disminuye su capacidad profesional) ^{3 43}.

Por otra parte no podemos obviar la degeneración que sufre la lámina ungueal, facilitando de esta forma la invasión de los hongos. Por este motivo en la mayoría de los casos de psoriasis ungueal de larga evolución cursan con una onicomicosis secundaria que nos dificulta el diagnóstico rápido ^{44 45}.

Por todo esto, la psoriasis es la segunda patología más frecuente que produce alteraciones ungueales ⁴⁵.

Sintomatología:

De la misma manera que ocurre con las lesiones a nivel dérmico, las manifestaciones en la uñas tienen una evolución por brotes, remisión, o cese del tratamiento. La sintomatología patognomónica son los pits y las manchas en aceite, pero también es frecuente encontrar traquioniquia, leuconiquia, lúnulas rojas, onicolisis, hemorragias en astilla e hiperqueratosis subungueal (ver figura 13) ^{3 46}.



Figura 13. Sintomatología de la Psoriasis ungueal. (De Izquierda a derecha) En la primera imagen podemos observar onicolisis, manchas en aceite y hemorragias en astilla. En la siguiente fotografía observamos un pie típico de pacientes con Psoriasis de larga evolución con afectación articular (Artritis psoriática) y dactilitis típica de la misma (aspecto de salchicha del dedo debido al edema y la inflamación) y las uñas presentan onicolisis y manchas en aceite. En la tercera imagen podemos ver onicolisis, pits, hemorragias en astilla, manchas en aceite y algo de hiperqueratosis subungueal. La última imagen corresponde a una psoriasis ungueal con onicomicosis secundaria.

Cambios ungueales producidos por la edad.

Durante el ciclo vital del ser humano las uñas sufren una serie de cambios que debemos conocer con el fin de no considerarlos patológicos, sino modificaciones morfológicas normales.

En la edad infantil y en especial durante la lactancia, a pesar de estar sanos, la uña puede presentarse extremadamente fina¹⁵, y principalmente pueden encontrarse las siguientes modificaciones: leuconiquia punteada, onicofagia, pitting, coiloniquia y separación laminar del borde libre (ver figura 14)⁴⁷.



Figura 14. En la imagen podemos observar separación laminar del borde libre frecuente en la edad infantil.

Con el paso del tiempo la se van observando modificaciones del trofismo ungueal debido a la disminución del contenido acuoso. Afectando de igual forma a la elasticidad el lecho ungueal y sufriendo un engrosamiento de la pared de los vasos, disminuyendo así el aporte sanguíneo ¹⁵.

Los principales cambios de deterioro ungueal se observan a partir de la quinta década de vida, las uñas empiezan a tomar un aspecto menos lustroso que es producido por la opacidad y palidez de la propia lámina, aumento del grosor y presencia de estrías. También es frecuente la aparición de variaciones en la concavidad de la uñas, transformándose en uñas en forma de vidrio de reloj o en forma de teja (ver figura 15) ^{15 47}.



Figura 15. Cambios de la lámina ungueal debidos a la edad. Observamos un aspecto menos lustroso que es producido por la opacidad y palidez de la propia lámina, aumento del grosor, presencia de estrías y cambios en la curvatura, de forma de teja.

3. Manejo de las onicopatías: Micosis y Psoriasis.

Historia clínica y exploración ungueal.

La exploración del aparato ungueal juega un papel muy importante, ya que con una simple exploración visual podemos aportar datos muy valiosos y útiles para la realización de diagnósticos diferenciales de las propias patologías o de enfermedades a nivel general ^{26 48}.

Todos los datos obtenidos en la exploración y los resultados de las pruebas complementarias tienen que ser reflejados en la historia clínica. De esta forma conseguiremos una herramienta imprescindible para poder hacer un diagnóstico y seguimiento exhaustivo y de calidad ^{7 26}.

Historia clínica: anamnesis.

La sintomatología con la que pueden cursar las patologías en las uñas pueden ser primarias o secundarias, es decir, alteraciones producidas por enfermedades de las uñas o alteraciones ungueales causadas por otra enfermedad como es en el caso de muchas dermatosis o enfermedades sistémicas. Por eso la necesidad de hacer una buena anamnesis para un correcto diagnóstico ^{7 48}.

En una anamnesis debemos incluir el debút o aparición de la patología y evolución de la lesión, ya que nos puede indicar si la enfermedad está estacionada o evoluciona. Además se debe reflejar la localización exacta de la lesión, la forma, el tamaño, el color y la homogeneidad de la misma. De igual manera, la toma de fármacos es importante ya que hay fármacos que tienen efectos secundarios sobre la estructura del aparato ungueal. Además, la profesión como los hobbies del paciente toman un papel relevante, ya que en su vida cotidiana pueden estar expuestos a agentes o factores que causan dicha alteración. Y no debemos pasar por alto la biomecánica, ya que nos puede explicar alteraciones en las uñas que son causadas por la deformidad estructural de los pies como puede ser en el caso de un dedo martillo ^{7 26 48}.

Exploración.

Para una buena exploración ungueal hay que tener en cuenta una serie de premisas. Las uñas deben de estar totalmente limpias de productos cosméticos o cualquier cosa que pueda interferir en la visualización de la alteración. Tener un foco de luz apropiado y directo enfocando a las uñas durante la exploración, ayudándonos de aparatos dermatológicos de aumento ⁴⁸.

La exploración visual debe ser meticulosa, detallada y desde todos los ángulos, siendo interesante el estudio de las 20 uñas ⁴⁸.

El cambio de coloración tras presionar la lámina ungueal nos puede ayudar para saber el origen de la alteración. Si tras presionar la lámina el color de la misma no cambia, entonces la patología está en la lámina. Pero si el color cambia el origen de la alteración está en el lecho ungueal. Si la alteración sigue el patrón de la lúnula la causa es interna y sería externa si sigue el patrón del pliegue proximal ^{26 48}.

Pruebas complementarias.

Con el fin de conseguir que un tratamiento sea eficaz, es necesario realizar un diagnóstico diferencial certero. Para ello necesitamos pruebas complementarias, ya que la información que nos aportan las manifestaciones clínicas es insuficiente en algunos casos ²⁰. Las pruebas complementarias que utilizamos para onicología son:

Pruebas de imagen:

Ecografía:

Técnica no invasiva que utiliza ultrasonidos de alta frecuencia. En el aparato ungueal se utiliza para examinar la presencia de alteraciones morfológicas en la matriz, lecho y lámina ⁷.

Capilaroscopia:

Técnica muy útil para el estudio de los capilares del pliegue proximal. Se realiza mediante una observación microscópica con aceite de inmersión ⁷.

Radiografía simple:

Prueba que se realiza para confirmar el diagnóstico cuando la alteración puede estar asociada a alguna modificación ósea ⁷.

Dermatoscopia:

Técnica muy útil y similar a la capilaroscopia pero que también se puede utilizar en seco. Se emplea para la observación de alteraciones melanocíticas y de estructuración del aparato ungueal ⁷.

Estudio microbiológico:

KOH:

Esta técnica consiste en un examen directo de la muestra. Se añade hidróxido de potasio (10%-40%) a la muestra de uña y se observa posteriormente al microscopio, con el fin de encontrar estructuras típicas fúngicas: hifas, conidias, etc ^{4 23}. Es una forma rápida y sencilla de

confirmar la infección micótica, pero un examen directo negativo no descarta la infección ya que en el 20% de los casos son falsos negativos ⁴⁹.

Cultivo.

El cultivo tradicional consiste en sembrar la muestra de uña en una placa de Petri con medio de cultivo Agar Sabouraud con Cloranfenicol. Este medio de cultivo es selectivo para aislar hongos. Es importante mantener en estufa a 30°C durante tres o cuatro semanas ^{4 23}.

Si en este período de tiempo no creció nada, se da como resultado negativo, es decir, no existe onicomicosis. Si, por lo contrario, hubo crecimiento (ver figura 16), se considera como resultado positivo y se realiza la identificación directa de estructuras morfológicas de hongos mediante microscopía óptica, usando azul de lactofenol para la tinción de las muestras (ver figura 17) ^{4 23}.

Es importante saber que los resultados que nos aportan los cultivos fracasan en un 40%, en los que obtenemos falsos negativos ⁴⁹.

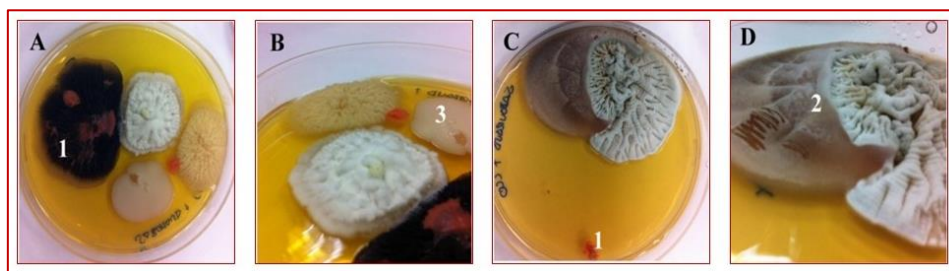


Figura 16. Cultivo tradicional en placas de Petri con Agar Sabouraud cloranfenicol, observando un crecimiento mixto de hongos a las cuatro semanas de la siembra. Se observa crecimiento de hongos no dermatofitos (1), dermatofitos (2) y también crecimiento de levaduras (3). En D observamos ampliada una sección de la imagen C, con visión lateral de hongos dermatofitos, donde se aprecia el relieve y morfología de las colonias.

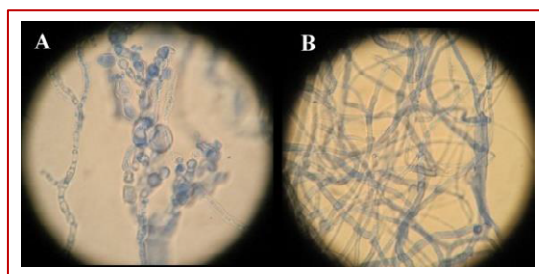


Figura 17. Visión microscópica de dermatofitos teñidos con azul de lactofenol. En A podemos observar un *T. Schoeleinii* y en B un *T. Mentagrophyte*.

Polymerase Chain Reaction (PCR).

Debido a que las técnicas tradicionales descritas anteriormente (KOH y cultivo) describen fallos en especificidad, sensibilidad, dificultades de interpretación y lentitud, y con el fin de solventarlas se están desarrollando técnicas moleculares y en especial la PCR para el diagnóstico micótico^{4 50}. Esta técnica se basa en la amplificación *in vitro* mediante la reacción en cadena de la polimerasa, enzima encargada de la duplicación del ADN fúngico. Como resultado obtenemos en pocas horas millones de copias del fragmento de ADN a estudiar^{4 49 51} (ver figura 18). Este ADN puede hacerse visible para identificar la presencia de hongos.

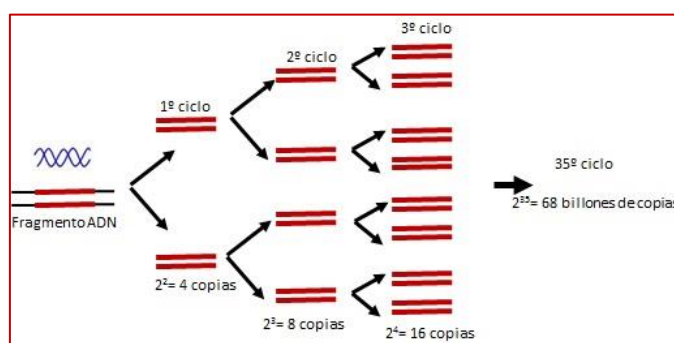


Figura 18. Representación gráfica de cómo a través de la PCR obtenemos en pocas horas billones de copias a partir de un fragmento de ADN.

Biopsia:

Esta técnica es la más efectiva y puede ser utilizada para la confirmación histopatológica de cualquier alteración ungueal. Es una técnica relativamente sencilla que consiste en la extirpación de parte del aparato ungueal, pero que requiere de un buen conocimiento anatómico del propio aparato y una cierta destreza quirúrgica. Dependiendo del tipo de afectación ungueal se realizara biopsia en tipo punch, elipse o longitudinal lateral (ver figura 19)¹⁹, pero en pocas ocasiones se realiza^{46 52}, probablemente debido a que es una técnica que requiere una alta pericia por parte del facultativo y porque la práctica de la misma es muy invasiva y en una considerable parte de los casos produce mayor alteración del aparato ungueal^{3 19}.



Figura 19. Tipos de biopsias ungueales. A) Longitudinal lateral. B) Punch. C) Elipse.

Por último vemos interesante comentar que los datos encontrados en la bibliografía muestran que las pruebas complementarias para diagnosticar onicopatías, tan sólo son solicitadas por el 3,4% de los médicos generales y el 39.6% de los dermatólogos ²¹. Sin embargo, no hemos encontrado hallazgos respecto a si los profesionales en podología realizan pruebas complementarias para el diagnóstico de las mismas. Esto apoya el hecho de que las alteraciones ungueales sean tratadas de forma empírica y den como resultado tratamientos frustrados, por lo complejo que es su diagnóstico clínico ²¹.

Diagnóstico.

Diagnóstico de onicomycosis.

En un primer lugar debemos hacer una exploración visual de la patología que presenta y comprobar que los signos son compatibles con la onicomycosis (onicolisis, detritus, hiperqueratosis subungueal, cromoniquia, destrucción de la lámina). En un segundo lugar, no debemos olvidar que las onicomycosis presentan signos clínicos comunes con numerosas enfermedades o patologías que aparecen en las uñas, de aquí que sea obligatorio hacer un diagnóstico diferencial previo al diagnóstico clínico ²⁰:

Diagnóstico diferencial de onicomycosis en adultos	Diagnóstico diferencial de onicomycosis en niños
<p style="text-align: center;"> Psoriasis Traumatismo ungueal Liquen plano Neoplasias Infecciones bacterianas </p>	<p style="text-align: center;"> Psoriasis Exóstosis subungueal Verrugas subungueales Hematoma subungueal Paraqueratosis pustulosa Paroniquia secundaria a chuparse los dedos </p>

Tabla 7. Diagnóstico diferenciales de la onicomycosis.

Y por último para hacer un diagnóstico certero de las micosis ungueales es imprescindible realizar pruebas complementarias. En este caso enviaremos al laboratorio de microbiología la cantidad suficiente de uña con sospecha de infección para que se realice un estudio micológico, ya sea por el método tradicional o biología molecular, para confirmar la presencia de hongos ^{4 31 53}.

Diagnóstico de Psoriasis ungueal.

Para hacer un diagnóstico certero de la patología ungueal, en aquellos pacientes que observamos signos compatibles con la psoriasis (traquioniquia, leuconiquia, lúnulas rojas, onicolisis, hemorragias en astilla e hiperqueratosis subungueal), en la actualidad está descrito el siguiente algoritmo de diagnóstico ⁸:

1. En un primer lugar explorar si existen más áreas afectadas con lesiones típicas en el resto del cuerpo y comprobar si es positivo el signo de Auspitz (sangrado tras la descamación mecánica).
2. Posteriormente hacer una exploración más minuciosa de los pliegues y del cuero cabelludo, ya que en el caso de psoriasis ungueal aislada se encuentran pequeñas descamaciones en estas zonas.
3. Debemos recoger muestra de la lámina ungueal para descartar la presencia de infección micótica, por dos razones: en primer lugar porque existen onicomycosis de sintomatología muy parecida con la psoriasis y en un segundo lugar porque ambas patologías están asociadas en muchos casos.
4. En pocas ocasiones se realiza la biopsia de la matriz y/o lecho ungueal para la confirmación estudio histopatológico por ser una técnica que requiere destreza, ser muy invasiva y que puede causar posibles secuelas. Pero en la actualidad es la única prueba que nos confirmaría la patología en todos los casos.

Valoración de las patologías ungueales.

Tras la bibliografía consultada solo hemos encontrados métodos validados para la valoración de onicopatías producidas por psoriasis y onicomycosis, los cuales describimos a continuación.

Valoración de la Psoriasis ungueal: Índice de Severidad de la Psoriasis Ungueal

Este método fue descrito y validado en el 2003 para evaluar la severidad de la psoriasis ungueal y de esta forma poder valorar objetivamente la progresión de la onicopatía (Nail Psoriasis Severity Index (NAPSI)). Pero tras dos años de su utilización en ensayos clínicos los autores se dieron cuenta que observando una clara mejoría de la uña seguían obteniendo los mismos resultados. Por lo que se describió el método NAPSI modificado ^{54 55}.

En primer lugar para poder realizar esta valoración por este método tenemos que dividir la uña en cuatro cuadrantes, con un eje longitudinal y otro transversal (ver figura 20).

Posteriormente buscaremos síntomas ungueales de origen matricial (pitting, leuconiquia, lúnula roja y traquioniquia), y los valoraremos por separado, cada síntoma por cuadrante, asignando un 0 en el caso de no presenta síntoma, un 1 si es leve, un dos si es moderado y un 3 si es una afectación severa.

A continuación buscaremos signos de origen en el lecho ungueal (Onicolisis, hiperqueratosis subungueal, manchas en aceite y hemorragias en astilla) y los evaluaremos de forma independiente por cuadrante de la misma forma que los anteriores. Así obtendremos una valoración total que oscilara en un rango de 0 a 96 puntos por uña.

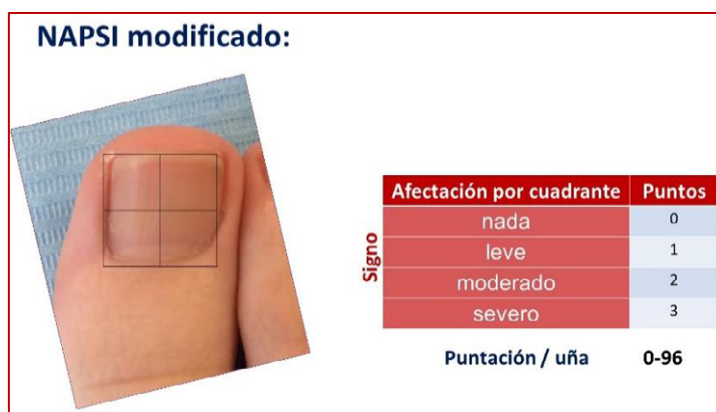


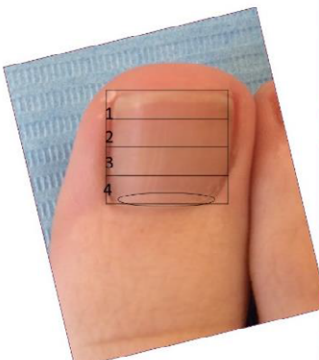
Figura 20. Simulacro de cómo llevar a cabo el NAPSI modificado por cada uno de los signos descritos en la enfermedad.

Valoración de la onicomicosis: Índice de Severidad de la Onicomicosis.

En un principio Sergeen et al. (2002) y Baran et al (2008) desarrollaron dos métodos para valorar el daño de la uña por micosis, pero no fueron validados. Posteriormente basándose en el método NAPSI para la evaluación de la afectación de la psoriasis ungueal se desarrolló el *índice de severidad de la onicomicosis (Onychomycosis Severity Index (OSI))*²⁸.

Este método valora tres aspectos que puede presentar la uñas micóticas, en primer lugar valora el área de afectación de la lámina. En segundo lugar la aproximación de la infección a la matriz que para ello dividiremos la uña en 4 partes (con tres ejes transversales). Por último se evalúa si existe la presencia de dermatofitomas y/o hiperqueratosis subungueal. En cada aspecto observado se le da una puntuación, para calcular la gravedad se multiplicaran los obtenidos en el área afectado por los obtenidos en la aproximación y se les sumara los de la presencia de dermatofitoma y/o hiperqueratosis (ver figura 21).

OSI



Área afectada	Puntos
Del 1 al 10%	1
Del 11 al 25%	2
Del 25 al 50 %	3
Del 51 al 75%	4
Más del 76%	5

Cuarto ungueal afectado	Puntos
Distal	1
Distal sin sobrepasa línea media	2
Sobrepasa línea media	3
Los cuatro cuartos sin afectar lúnula	4
Si existe invasión de la lúnula	5

Dermatofitoma ó Hiperqueratosis sub.> 2mm	Puntos
NO	0
SI	10

Figura 21. Método OSI. Simulacro de la división de la lámina ungueal y baremación.

La onicomicosis se clasificará como leve si obtenemos de 0 a 5 puntos, como moderada de 6 a 15 puntos y grave de 16 a 35 puntos.

Si la puntuación es cero o la afectación es del 1 % al 10 % y con el cultivo micológico negativo se considera curada.

Tratamientos.

Abordaje terapéutico de la onicomicosis.

Consideramos que una onicomicosis está curada cuando la uña recupera su fenotipo normal y los resultados de los cultivos micológicos son negativos. Para alcanzar una mayor tasa de curación de estas patologías hay que tener en cuenta el tipo de onicomicosis que se trata, el número total de uñas que están infectadas y la intensidad de la misma. El pronóstico en las onicomicosis graves según el OSI no es muy esperanzador ^{27 28 31}.

Para el tratamiento de estas micosis se barajan terapias tópicas, sistémicas o la triple terapia, según indicamos a continuación:

Tópico:

Consiste en la aplicación de lacas de amorolfina al 5% o de ciclopiroxolamina al 8% sobre la lámina, en el caso de las onicomicosis blancas superficiales y las superficiales distales ²⁷.

Sistémico:

Esta terapia está indicada en las onicomicosis superficiales distales de larga evolución y en las onicomicosis subungueales proximales. Con los fármacos orales se alcanza más efectividad y en combinación con la terapia tópica se consiguen tasas aún mayores de curación. Los antimicóticos orales que se pautan para estas infecciones son: terbinafina, itraconazol o fluconazol. En el caso de la terbinafina y del itraconazol podemos optar por las terapias pulsátiles ^{27 31}.

Triple terapia:

Es la estrategia terapéutica con la que podemos llegar a erradicar las onicomicosis distróficas totales y consiste en la suma de la terapia tópica, sistémica y la avulsión de la lámina. La avulsión puede ser quirúrgica, mecánica o química, en el caso de la avulsión química existen pomadas que combinan la avulsión y el tratamiento tópico ²⁷.

A nivel general son muy frecuentes las tasas de recidivas de las onicomicosis. Estas tasas se pueden disminuir si aconsejamos aplicaciones periódicas de lacas antifúngicas, cuando consideramos que las uñas están curadas ^{27 31}.

Principales antimicóticos.

En la tabla 8 se exponen los principales antimicóticos empleados en podología, posología y tasas de curación.

Antimicótico oral	Dosis	Duración	Tasa curación
<i>Terbinafina</i>	Tto. Continuo 250 mg /día	12 meses	53-78%
	Tto. Pulsatil 500mg dia/1 semana y 3 semanas sin tto. (1 pulso)	4 pulsos	
<i>Itraconazol*</i>	Tto. Continuo 250 mg /día	3 meses	66%
	Tto. Pulsatil 500mg dia/1 semana y 3 semanas sin tto. (1 pulso)	3 pulsos	69%

Antimicótico tópico

Ciclopirox 8%	Aplicación diaria	4 meses	47-67%
Amorolfina 5%	1 o 2 aplicaciones semanales	6 a 12 meses	38-54%

Tratamiento combinado

Combinación A	Itraconazol 200mg/día	3 meses	94%
	Amorolfina 5% laca Aplicación semanal	6 meses	
Combinación B	Terbinafina 250mg/día	3 meses	73.2%
	Amorolfina 5% laca Aplicación semanal	15 meses	

Tabla 8. Tratamiento farmacológico de la micosis ungueal. Extraído y adaptado de Leelavathi M, Noorlaily M. Onychomycosis nailed. Malaysian Fam physician Off J Acad Fam Physicians Malaysia. 2014; 9 (1):2-7.

* Debido a la hepatotoxicidad del Itraconazol se recomienda control de la actividad hepática.

Manejo terapéutico de la psoriasis ungueal.

Los tratamientos sistémico o biológicos pautados para las lesiones psoriásicas a nivel dérmico mejoran la sintomatología ungueal. Por esto, el tratamiento local estaría dirigido a aquellos sujetos que solo manifiestan patología a nivel ungueal de forma aislada o en aquellos en los que cause un impacto psicosocial considerable^{3 43}.

Para llevar a cabo un buen manejo en el tratamiento de esta patología es aconsejable que sigamos el siguiente algoritmo terapéutico³:

1. Debemos realizar cultivos antes y durante la terapia, tanto bacteriológico como micótico. Con el fin de controlar las sobreinfecciones.
2. Hacer un registro exhaustivo de la descripción morfológica de la lesiones y no debemos olvidar calcular el NAPSI.
3. Pautar los siguientes consejos:
 - a. Prevenir traumatismos.
 - b. Evitar la humedad prolongada.
 - c. No cortarse la uñas tras el baño.
 - d. Vigilar cambios de coloración.
4. El paciente manifiesta artritis psoriática:

SI: será necesaria una valoración por el servicio de reumatología y pautar tratamiento en conjunto.

NO: pautar tratamiento dermatológico y/o local si fuera preciso.

5. ¿Tiene pautado tratamiento para las lesiones dérmicas?:

Si: existe una alta posibilidad que la patología ungueal mejore.

NO: pautar tratamiento para la patología ungueal.

- Si manifiesta lesiones en el lecho ungueal pautaremos derivados de Vit D.
- En lesiones aisladas en la matriz en algún dedo infiltraremos corticoides y si se manifiestan en varios dedos aplicaremos lacas de clobetasol 8%.
- Existen lesiones en matriz y en lecho combinaremos los tratamientos o *Hidroxi propil quitosano*.
- Si no obtenemos mejoría aplicaremos tazaroteno gel 0.1% o PUVA tópico.

Principales tratamientos para la Psoriasis ungueal ^{3 43 56}.

Tratamientos tópicos:

Con la aplicación de los tratamientos tópicos se ha conseguido eliminar las posibles atrofas y taquifilaxia de los corticoides, que podían producir las infiltraciones intralesionales.

Corticoide:

Para conseguir una mejor penetración utilizaremos lacas ungueales que aseguramos que traspase la lámina, mediante formulación magistral.

Clobetasol 8%:

Aplicación diaria durante los primeros 21 días y en los siguientes 9 meses 2 aplicaciones por semana. Observaremos mejoría en pitting, onicolisis, manchas en aceite y remisión del dolor. Añadiremos a la formulación clotrimazol al 1% para aquellos pacientes que exista un riesgo de sobreinfección micótica.

Derivados de la vitamina D:

Los principales derivados de la vitamina D comercializados en España para la psoriasis ungueal son calcipotriol, tacalcitol y calcitriol. Aunque el más estudiado es el calcipotriol.

Calcipotriol (50mg/g):

Aplicaremos el ungüento dos veces al día, observando mejoría en los síntomas del lecho ungueal (en especial de la hiperqueratosis).

Tratamiento combinado:

Con el fin de conseguir una eficacia y seguridad en el tratamiento local en la uña, es recomendable la utilización de la combinación de los corticoides con la Vit D.

Calcipotriol con clobetasol 0.05%:

Esta terapia combinada consiste en la aplicación de calcipotriol nocturno de lunes a viernes y durante los fines de semana aplicamos clobetasol. El estudio solo refleja que existe una mejoría del 77% de la hiperqueratosis, no reflejan los resultados para el resto de sintomatología.

Tacalcitol con clobetasol 8%:

Es este caso aplicaremos los días laborales una aplicación del derivado de la Vit D y en los fines de semanas la laca de clobetasol 8%, durante 6 meses. Con esta combinación observaremos mejoría en los síntomas del lecho y de la matriz, en especial en el pitting.

Hidroxi propil quitosano:

Estudios recientes han demostrado que la aplicación diaria de lacas ungueales con este componente durante 24 semanas mejora los aspectos clínicos de la psoriasis ungueal tras 16 semanas de uso. Observando mayores mejorías en leuconiquia, onicolisis y pitting.

Tazaroteno:

Existen trabajos en los que confirman que la aplicación de tazaroteno en crema al 1%, aplicación diaria durante 12 semanas, se observa mejoría en el pitting, onicolisis, manchas en aceite y con una mayor acción prolongada postratamiento en la hiperqueratosis.

5-fluorouracilo:

Utilizada de forma esporádica al 1% en crema de urea al 20% o en propilenglicol. Observa mejorías en los síntomas matriciales, pero puede producir onicolisis secundaria.

Ditranol:

Aplicación de corto contacto de ungüentos de ditranol 0.4-2%.

Ciclosporina:

Los estudios que aplicaron esta terapia, previamente avulsionaron la lámina ungueal y utilizaron ciclosporina 10% en un vehículo graso y aplicación durante meses. Estos trabajos describen resultados favorables para el lecho.

PUVA:

Consiste en la combinación de baños en un psoralen (8-MOP) y posterior exposición a los UVA. Teniendo precaución porque existe riesgo de quemadura.

Tratamientos sistémicos:

La pauta de tratamientos sistémicos para la resolución de la psoriasis ungueal se realiza de forma aislada según el consenso europeo para el tratamiento de psoriasis. Pero debemos tener conocimiento de ellos, a continuación señalaremos los principales aspectos de estos.

Retinoides:

El más empleado es el acitretino en dosis de 0.5mg/kg al día para la psoriasis pustulosa. En la combinación PUVA para psoriasis palmo-plantar con repercusión ungueal.

Con este tratamiento obtenemos beneficios en la hiperqueratosis subungueal, pero encontramos como efectos secundarios a nivel ungueal: onicolisis, fragilidad y granuloma piogénicos.

Metotrexato:

Tiene eficacia para la psoriasis pustulosa, mejorando simultáneamente la psoriasis ungueal sin efectos secundarios, aunque se manifiesta enlentecimiento de crecimiento ungueal.

Ciclosporina:

En un elevado número pacientes en tratamiento para psoriasis con ciclosporina sistémica a dosis de 5mg/g/día se observa mejoría persistente en las lesiones del lecho y de la matriz.

Encontraremos mayores mejorías a nivel de piel, uña y articular si la utilizamos a dosis de 2.5mg/kg/día en combinación con etretinato 0.5-0.75 mg/kg/día.

Biológicos:

Existen varios tratamientos biológicos con efectividad para el abordaje de la psoriasis como por ejemplo: alefacept, efalizumab, etanercept e infliximab, pero solo los tres últimos se comercializan en España. Su uso no está autorizado para el tratamiento aislado de la psoriasis

ungueal pero se ha observado una mejoría ungueal significativa con el uso de efalizumab e infliximab durante 24 semanas, cuando se pauta a nivel dérmico.

Importancia y comorbilidades de la patología ungueal.

Como ya sabemos la sintomatología de la patología ungueal es bastante inespecífica, ya que sus manifestaciones son concomitantes y no solo es causada por patologías específicas del propio aparato ungueal. Pero por otro lado, no podemos olvidar que en muchas ocasiones la aparición de una patología ungueal representa en si misma los primeros síntomas de otras patologías presentes en el organismo, de tal manera que estas alteraciones son una herramienta muy valiosa para detectar y/o diagnosticar precozmente enfermedades sistémicas, demartopatías, trastornos hereditarios y/o congénitos, tumoraciones, insuficiencia renal, entre otras. Así mismo existen onicopatías inducidas por fármacos, drogas, hábitos ocupacionales, etc....^{1 57}.

Por otra parte, no puede pasar desapercibido el componente psicológico asociado a estas patologías con una magnitud negativa. Los pacientes que las sufren experimentan vergüenza, pueden ser tratados como personas que no tienen higiene, son considerados además fuentes de infección, afectando a su autoestima y produciendo un autoaislamiento social y profesional^{23 58}. Pueden incluso llegar a cursar con depresión, ansiedad, dificultad para expresar sus emociones e incluso intención suicida los pacientes que cursan con una psoriasis severa⁵⁸.

III. Objetivos

1. Objetivo principal

- Mejorar el abordaje clínico de las alteraciones ungueales.

2. Objetivos secundarios

- Mejorar el diagnóstico de las alteraciones ungueales mediante técnicas moleculares para detectar la infección fúngica de la uña y la psoriasis ungueal.
- Estudiar la efectividad del láser Nd:YAG 1064nm para el tratamiento de las alteraciones ungueales de origen micótico e idiopático.

IV. Preámbulo

Para poder alcanzar los objetivos marcados con el presente trabajo, han sido necesarias varias fases experimentales de desarrollo. Cada una de estas fases ha requerido trabajos con un muestreo diferente y que en algunas ocasiones no están relacionados entre sí. Con el fin de hacer comprensible la visión general y el manejo de los datos del mismo, los trabajos se presentan por separado.

Además, para lograr una visión general del trabajo, a pesar que cada apartado contiene su discusión, al final hemos incorporado una discusión general de los principales datos obtenidos.

V. Diagnóstico de las alteraciones ungueales: Micosis y Psoriasis. Propuestas para su mejora.

El diagnóstico diferencial de las alteraciones ungueales es fundamental si queremos mejorar la terapia en este campo. En la mayoría de los casos el diagnóstico clínico es deficiente y por tanto el tratamiento puede ser ineficaz.

Nuestro trabajo en los últimos años ha estado enfocado fundamentalmente hacia la mejora de las técnicas empleadas para el diagnóstico.

En primer lugar, quisimos utilizar los avances en biología molecular para poner en marcha una técnica certera y precisa que confirmara la micosis.

1. Diagnóstico de onicomycosis mediante PCR.

Estado actual del tema.

Para confirmar un diagnóstico de infección fúngica hasta hace relativamente poco tiempo se utilizaba el método tradicional que consistía básicamente en una visión directa al microscopio con KOH y la realización del cultivo correspondiente ^{4 53}. Sin embargo, esta metodología presenta dos inconvenientes principales: por un lado, el examen directo al microscopio da resultados falsos negativos en un 5 a un 15% de los casos ^{49 59 51 60}, y en segundo lugar, la siembra en placa con medios de cultivo específicos requiere de 2 a 4 semanas para la confirmación de la presencia del microorganismo y la identificación de la especie correspondiente, añadiéndole que en el 40% fracasa ^{2 49 61}.

Por otro lado el desarrollo de la biología molecular y la accesibilidad de las bases de datos de secuencias biológicas, han permitido, en general, la mejora en la sensibilidad y especificidad de muchos métodos de diagnóstico en clínica, aunque en el campo de las micosis, esta aplicación es sólo incipiente ^{51 60 62 63}. Basándose en estos trabajos se han desarrollados nuevas investigaciones en las que a partir de un fragmento de uña se han identificado la presencia de hongos mediante PCR convencional, centrándose en la detección de hongos dermatofitos ^{4 49 51 64}, que en nuestro laboratorio (dentro del Grupo de investigación DEDAP) realizamos de manera rutinaria ⁶⁵.

El tratamiento para las infecciones por hongos dermatofitos suele ser genérico y afecta a todas las especies de dermatofitos en general. Sin embargo, existen distintos principios activos que muestran eficacias diferentes en las distintas especies de hongos. Las candidas por ejemplo son más sensibles al fluconazol, pero existen especies muy resistentes a dicho principio (*C. Krusei*) ⁶⁶. Dada la importancia que, para la resolución de posibles resistencias a tratamientos con antifúngicos, puede tener la identificación de especies concretas de microorganismos infectantes, consideramos muy necesario una técnica complementaria como es la PCR con la

que detectar la presencia de microorganismos y por tanto poder diagnosticar la onicomicosis, y sobre todo si además esta técnica nos identifica el agente causante. Mediante el presente estudio comparamos la sensibilidad para detección de la infección mediante el cultivo tradicional y la PCR.

Introducción a la PCR.

Como apuntamos anteriormente, esta técnica se basa en la amplificación *in-vitro* del de las cadenas de ADN mediante una reacción en cadena de la enzima polimerasa, que es la encargada de la duplicación del mismo dentro de las células en los organismos vivos. Como resultado de esta reacción repetida, obtenemos, en pocas horas, billones de copias del fragmento de ADN a estudiar o identificar ^{4 49 51}.

Para lograr la actividad de la ADN polimerasa se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para que las cadenas de ADN se separen, se dupliquen, y posteriormente vuelvan a unirse y puedan ser replicadas de nuevo. Esta técnica fue puesta en marcha en la década de los 80. Por entonces era una técnica muy lenta porque la enzima se desnaturalizaba con los cambios de temperatura y era necesario añadirla de nuevo en cada ciclo. Para evitar este contratiempo se empezó a emplear una ADN polimerasa extraída de organismos adaptados a vivir en medios con altas temperaturas, mejorando la técnica en gran medida ^{67 68 69 70}.

Gracias a los avances tecnológicos y a los automatismos, en la actualidad este proceso se lleva a cabo de forma automática por un aparato llamado termociclador (ver figura 22), mediante el cual conseguimos cambios de temperatura en décimas de segundo, lo que permite realizar una gran cantidad de ciclos a distintas temperaturas en poco tiempo.

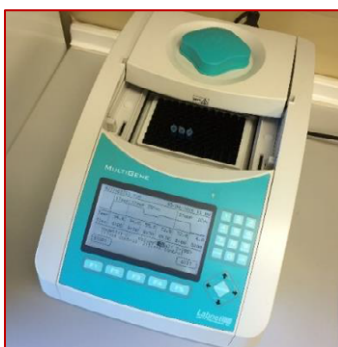


Figura 22. Termociclador.

Con todo ello se ha logrado una técnica de alta sensibilidad, especificidad, eficiencia y fidelidad, haciendo que sea utilizada tanto en los laboratorios de investigación para un amplio abanico de aplicaciones, como en los laboratorios de análisis clínicos para la detección y diagnóstico de enfermedades infecciosas o de carácter hereditario. Básicamente, si el agente infectante está (aunque esté muerto) la técnica lo detecta porque amplía su ADN, mientras que con técnicas tradicionales de cultivo, no solo necesitamos que el microorganismo esté, sino que además tiene que estar vivo y crecer adecuadamente en la placa de cultivo para poder detectarlo ^{69 70 71 72}.

Para poder amplificar el fragmento de ADN elegido, a parte del termociclador, necesitamos una serie de reactivos: el ADN molde o ADN "template" (ADN que se somete a estudio procedente de la muestra), la enzima que haga posible la replicación del ADN, los oligo-nucleótidos, cebadores o "primers" que marcan el punto de inicio y terminación del proceso, delimitando el fragmento a ampliar, los desoxirribonucleótidos-trifosfato (dNTPs) : adenina, timina, citosina y guanina para crear las cadenas, el ión magnesio (Mg +), solución amortiguadora o buffer y H₂O. Todos ellos son utilizados en las etapas principales de la PCR: desnaturalización, hibridación, extensión y terminación ^{69 72}.

Desnaturalización:

Esta etapa consiste en separar las dos cadenas de ADN. Para ello sometemos al ADN a una temperatura de 95 °C unos 20-50 segundos, el tiempo dependerá de la cantidad de enlaces entre G-C que tenga la secuencia del ADN molde. Necesitamos más tiempo para romper el triple enlace que une G-C, que el doble enlace entre A-T. Por otro lado el tiempo también variará dependiendo de las características técnicas del termociclador ⁷².

Una vez transcurrida la incubación tendremos las cadenas separadas y preparadas para la siguiente fase ⁷².

Hibridación:

Durante esta etapa los primers se alinean en los extremo 3' de las cadenas de ADN separadas y se hibridan (unión) a su región complementaria, formando así el complejo ADN template-primers. Para que esto ocurra es necesario una temperatura adecuada entre 50-60°C (temperatura de hibridación o temperatura de melting (T_m)) ⁷².

Extensión:

Durante esta etapa la Taq polimerasa (denominada así debido a que es producida por la bacteria *Thermus aquaticus* (T-aq)) empieza a añadir a gran velocidad los dNTP's complementarios a la cadena de ADN molde en dirección 5'-3'. La temperatura adecuada para que la Taq polimerasa alcance su mayor rendimiento es de 72°C. El tiempo de extensión es dependiente de dos factores, la polimerasa usada y la longitud del fragmento de ADN que se quiere amplificar. Si conseguimos un equilibrio entre los factores, conseguiremos una optimización del proceso en el que la polimerasa funcionará uniendo mil bases por minuto ⁷².

Posteriormente se realizará una elongación final después del último ciclo de PCR durante 5-15min a 70-74°C para asegurar que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente copiado ⁷².

Revelado de los resultados.

Para hacer una lectura de los resultados obtenidos en la PCR se realiza una electroforesis en gel de agarosa. Este método consiste en la separación de las moléculas de los ácidos nucleicos obtenidos a través de un gel de agarosa que actúa como un filtro y separa las diferentes moléculas tras ser sometido a un campo eléctrico. La separación se realiza en base al tamaño y la carga eléctrica de la molécula (ver figura 23) ^{72 73}.

El gel de agarosa es teñido con bromuro de etidio que se une al ADN de doble cadena y cuando este es sometido a luz UV se pueden visualizar los fragmentos de ADN obtenidos o amplicones en forma de bandas (ver figura 23) ^{72 73}.

Cuando sometemos a los amplicones a una electroforesis, debemos hacerlo junto a un marcador molecular con un número determinado de segmentos de ADN conocidos, con el que contrastar los resultados obtenidos y comprobar si se corresponde al estudiado (ver figura 23) ^{72 73}.

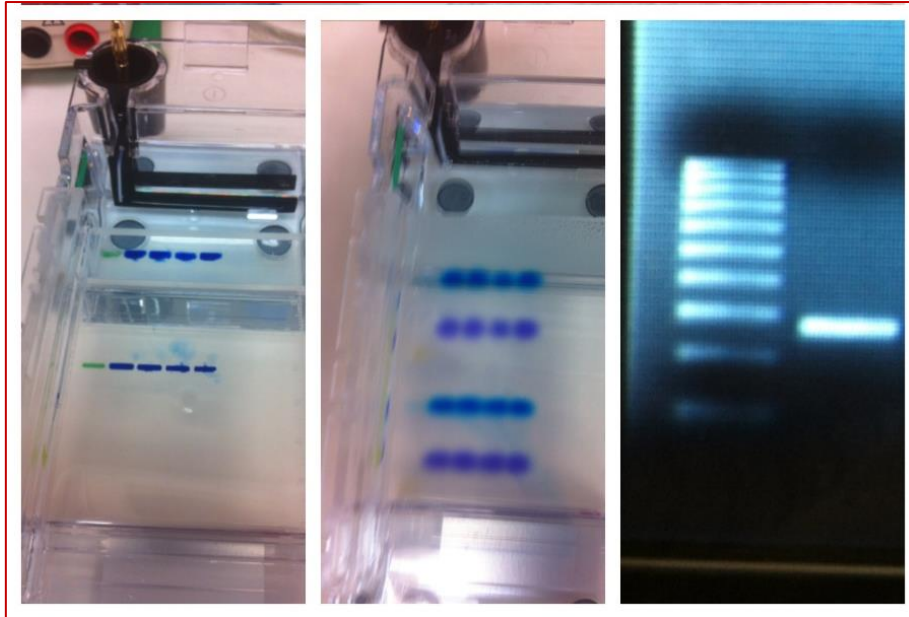


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa del producto obtenido en una PCR. En la primera imagen podemos observar un gel de agarosa de doble peine teñido con bromuro de etidio. En los primeros pocillos se ha cargado el marcador de peso molecular (verde) y los cuatro restantes son el producto obtenido de la PCR (Azules). En la imagen del centro observamos la migración de la muestra a través del gel de agarosa tras ser sometido a un campo eléctrico. Y en la imagen de la derecha observamos un gel sometido a luz UV (tras la electroforesis) en la que se ve el marcador de peso molecular a la izquierda (el primer escalón pertenece a una banda de un tamaño de 100pb y el último a 1000pb) y a la derecha la banda de un amplicón de aproximadamente 300pb.

Puesta en marcha el uso de la PCR para la detección directa de Hongos dermatofitos en las uñas.

A continuación adjuntamos el trabajo original titulado *“Using a Polymerase Chain Reaction as a Complementary Test to Improve the Detection of Dermatophyte Fungus in Nails”* y publicado en Mayo del 2014 en *Journal of the American Podiatric Medical Association*, en el que se recopila toda la información sobre el desarrollo del mismo.

Using a Polymerase Chain Reaction as a Complementary Test to Improve the Detection of Dermatophyte Fungus in Nails

María José Iglesias Sánchez, PhD*
Ana María Pérez Pico, MS†
Félix Marcos Tejedor, MS†
María Jesús Iglesias Sánchez, MS‡
Raquel Mayordomo Acevedo, PhD§

Background: Dermatophytes are a group of pathologic abnormalities frequently seen in clinical practice, and their prevalence has increased in recent decades. Diagnostic confirmation of mycotic infection in nails is essential because there are several pathologic conditions with similar clinical manifestations. The classical method for confirming the presence of fungus in nail is microbiological culture and the identification of morphological structures by microscopy.

Methods: We devised a nested polymerase chain reaction (PCR) that amplifies specific DNA sequences of dermatophyte fungus that is notably faster than the 3 to 4 weeks that the traditional procedure takes. We compared this new technique and the conventional plate culture method in 225 nail samples. The results were subjected to statistical analysis.

Results: We found concordance in 78.2% of the samples analyzed by the two methods and increased sensitivity when simultaneously using the two methods to analyze clinical samples. Now we can confirm the presence of dermatophyte fungus in most of the positive samples in just 24 hours, and we have to wait for the result of culture only in negative PCR cases.

Conclusions: Although this PCR cannot, at present, substitute for the traditional culture method in the detection of dermatophyte infection of the nails, it can be used as a complementary technique because its main advantage lies in the significant reduction of time used for diagnosis, in addition to higher sensitivity. (J Am Podiatr Med Assoc 104(3): 233-237, 2014)

Dermatophytes are a group of related fungi that belong to three genera: *Epidermophyton*, *Microsporum*, and *Trichophyton*, each of which includes several species. These fungi are keratinophilic and infect superficial keratinized tissues (skin, hair, and

nails) in humans and animals, causing cutaneous mycoses known as dermatomycoses.¹ The prevalence of dermatomycoses in European countries varies between 3% and 22%, and there has been a recent increase globally that is attributed to the growing levels of several pathologic conditions, such as immunodepressive syndromes, diabetes mellitus, organ transplants, and the use of corticosteroids and antineoplastic drugs.^{2,3}

The habitual diagnosis of dermatomycosis is based on the detection of morphological structures of fungi by direct observation under the microscope, followed by in vitro culture and identification of the fungal species.⁴⁻⁹ In the case of onychomycosis in particular it is necessary to make a differential diagnosis owing to the existence of a

*Departamento de Terapéutica Médico-Quirúrgica, Universidad de Extremadura, Plasencia, Spain.

†Titulación de Podología, Centro Universitario de Plasencia, Universidad de Extremadura, Plasencia, Spain.

‡Instituto de Neurociencias de Castilla y León, Salamanca, Spain.

§Departamento de Anatomía, Universidad de Extremadura, Plasencia, Spain.

Corresponding authors: María José Iglesias Sánchez and Raquel Mayordomo Acevedo, Centro Universitario de Plasencia, Universidad de Extremadura, Avda Virgen del Puerto 2, 10600-Plasencia, Spain. (E-mail: maiglesiass@unex.es or rmayordo@unex.es)

variety of pathologic abnormalities that present similar symptoms, such as onychodystrophies originated by psoriasis, lichen planus, chronic paronychia, traumatism, the physiologic changes of aging, yellow nail syndrome, and other unusual syndromes.^{4,10}

The microbiological method of detecting or discarding fungal infection, however, has two main disadvantages: first, direct microscope examination gives false-negative results in 5% to 15% of cases^{6,11,12} and, second, fungal growth on plates with specific culture media requires 2 to 4 weeks.^{6,8}

The development of molecular biology and the accessibility of databases of biological sequences have led, in general, to an improvement in the sensitivity and specificity of many diagnostic methods. However, in the field of mycoses, this application is just beginning to be used.¹²⁻¹⁵

In our molecular diagnostics laboratory at Centro Universitario de Plasencia (Cáceres, Spain), we detect dermatophytes in nail samples by extracting DNA from nails, followed by polymerase chain reaction (PCR). This PCR is based on a method previously described¹¹ that allows us to detect the presence of genetic material belonging to the dermatophyte genera while simultaneously identifying the most frequent causal agent: *Trichophyton rubrum*.^{11,16,17} We performed a comparative study of the sensitivity of the two techniques to determine whether we could replace the plate culture with the new PCR.

Application of the PCR technique has brought about a remarkable improvement in the diagnosis of onychodystrophies at University Podiatric Clinic (Plasencia, Spain), especially regarding reduction in the time for diagnosis confirmation.

Materials and Methods

Clinical Nail Samples

This study was performed with samples harvested from three clinical centers in the north of the Cáceres province (Spain) between January 2, 2009, and December 22, 2011. These centers were the University Podiatric Clinic of Plasencia, the Psychiatric Hospital of Plasencia, and the Residential and Family Centre in Nuñomoral, Spain. Samples consisted of pieces of nails from 232 cases of suspected nail fungal infection. Before the start of this study, we obtained permission from the Bioethical Commission of the University of Extremadura (Badajoz, Spain) for working with human samples.

Cultures

The nail samples were sown on a plate with Sabouraud agar plus chloramphenicol culture medium, which is selective for the isolation of dermatophyte fungi and yeasts, and were kept at 30°C for 3 or 4 weeks. Identification of the morphological structures of the fungi was performed by optical microscopy using a lactophenol blue solution as a staining agent⁴ to determine the species.

Polymerase Chain Reaction

Molecular analysis was performed on fragments of the same nail samples. First, DNA extraction was made using the reactive agent InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) in accordance with the manufacturer's instructions.

The PCR was performed using a reaction volume of 25 µL with the following composition: 4 µL of DNA solution, 2.5 µL of buffer reaction, 2 µL of a mixture of deoxynucleotide triphosphates (2.5 mM each), 2.5 µL of 25 mM magnesium chloride, 0.2 µL of 100 ng/µL oligonucleotides, and 0.3 µL of Taq polymerase (Biotools DNA Polymerase; Biotools B&M Labs SA, Madrid, Spain).

The reaction cycles were as follows: a first cycle for 5 min at 95°C; then 35 cycles for 30 sec at 94°C, 30 sec at 58°C, and 30 sec at 72°C; and, finally, a step at 72°C for 6 min.

For the first PCR, four previously described oligonucleotides¹¹ were used: Derm1, Derm2, Tr, and uni. The first two amplified a fragment of the chitin synthase 1 of dermatophyte genera, with a size of 366 base pair (bp), as described by Brillowska-Dabrowska et al,¹¹ who tested 12 dermatophyte reference strains, 89 clinical dermatophyte isolates, 22 nondermatophyte fungal isolates, and purified human DNA. The second primer pair amplified a sequence of *T rubrum* located in an intergenic spacer region of ribosomal DNA. The length of the amplified DNA was 203 bp (Fig. 1).

Finally, to increase the sensitivity of the amplification, we designed another pair of primers named N1 (5'GCCGGTCTAGGTGTTTACCA3') and N2 (5'GTTCCAGCATCGAGGAGAA3') to perform a nested PCR, which amplified an internal fragment of 269 bp in the 366-bp segment described in the previous paragraph. To standardize the reaction, different conditions of reagent concentrations were tested, as were different temperatures of the steps (data not shown).

The results were visualized through a 1% agarose

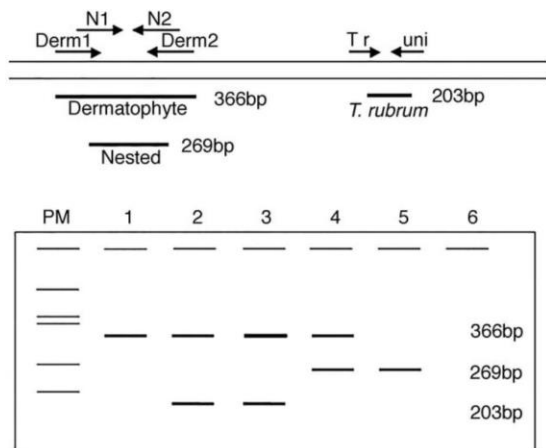


Figure 1. Schematic representation of the polymerase chain reaction (PCR) technique. Top, The genome is designed as two long parallel lines. The arrows represent the oligonucleotides used, and the DNA fragments amplified correspond to the thick lines, with their respective sizes expressed in base pair (bp). Bottom, The different results that can be found in an agarose gel: lines 1, 2, and 3 are the hypothetical results of the first PCR (line 1 corresponds to any species of dermatophyte other than *Trichophyton rubrum*, and lines 2 and 3 are *T. rubrum* samples). Lines 4 and 5 correspond to the nested PCR of dermatophyte genera. Line 6 corresponds to negative control (a reaction tube without fungal DNA). Line PM represents a molecular weight marker in order to have a reference of DNA fragments size.

electrophoresis gel stained with ethidium bromide. Figure 1 shows a diagram of a hypothetical gel, and Figure 2 shows the amplification products of different samples.

Results

A total of 232 samples were examined by direct microscopy after treatment with 20% potassium hydroxide and were cultivated on plates with Sabouraud plus cloramphenicol medium for 3 to 4 weeks at 30°C. In the case of positive growth, a morphological study was performed with a microscope to identify the species. After 4 weeks, cultures that did not show growth were considered negative.

Direct DNA extraction was taken from 225 nail fragment samples (in seven cases the amount of sample was insufficient and the samples were

discarded). From the DNA, two consecutive amplifications were made using the conditions described in the "Materials and Methods" section for the detection of two specific sequences of dermatophyte fungi.

The size of the nail sample taken is usually very small, which means that the number of copies of genetic material that can be detected is very low. For this reason, we decided to use a nested PCR, although it involved the adoption of greater control in the laboratory, taking steps to avoid contamination.

We verified that we had, in fact, obtained an increase in sensitivity of approximately 15% (data not shown), and no case showed evidence of contamination. A schematic representation of the design and the results of the PCR are shown in Figure 1. An example of the results of the amplification of some samples in an agarose gel is shown in Figure 2.

In agreement with previous studies, we obtained a high proportion of negative samples for dermato-

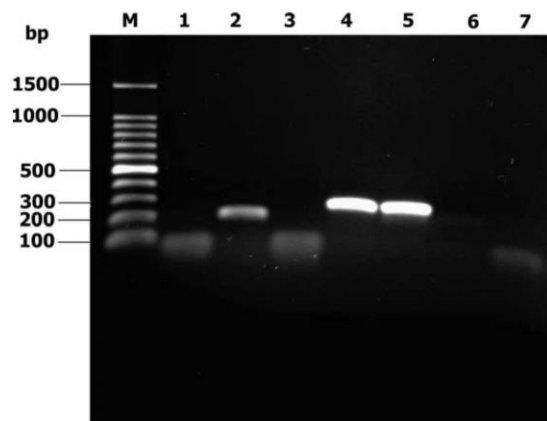


Figure 2. Polymerase chain reaction (PCR) products analyzed in an agarose gel electrophoresis. M represents the molecular weight marker (100–base pair [bp] DNA ladder); lines 1, 2, and 3 contain the product of the first PCR, where *Trichophyton rubrum* fragments can be seen but dermatophyte in specific DNA fragments are too light. Nested PCR products of the same samples are in lines 4 to 6. Lines 1 and 4 show the results corresponding to any dermatophyte species other than *T. rubrum*. Lines 2 and 5 display the two bands corresponding to a sample containing *T. rubrum*: (203 bp) and the 269-bp band corresponding to dermatophyte genera. Lines 3 and 6 display the negative results of a sample. Line 7 contains the negative control.

phyte detection using the two techniques: classical growth in culture and DNA amplification. We could not find any proof of dermatophyte fungal infection in 119 of 225 samples with suspected onychomycosis (52.9%). A high proportion of these negative samples presented growth of *Candida* species (30.3%, 36 of 119) (data not shown), although we consider that a high proportion of them are the product of a process of colonization but not a real infection.

We have to consider these data and emphasize that only half of the cases that seem to be mycoses are fungal infections to improve the differential diagnosis of pathologic conditions of the nails.

The two techniques are not fully coincident as we obtained concordance in only 78.2% of the samples (52.9% negative plus 25.3% positive results).

The number of samples that were positive with at least one of the two methods was 163 (72.4%). In 73 cases we detected DNA from the microorganism, and dermatophytes grew on 90 of 225 plates (Table 1).

Of the 49 samples with discordant results, 16 were positive for PCR but did not grow in culture, and in the 33 cases that grew in culture, the PCR did not detect DNA corresponding to dermatophytes. The comparison of the results obtained from the two techniques was subjected to statistical analysis, and the significance test (the McNemar test) showed $P = .023$.

Discussion

Molecular biology has brought about important advances in diagnostic techniques in many fields of clinical medicine. In the case of identification of dermatophyte fungi, there are two fundamental advantages a priori: the quickness and, perhaps more importantly, the use of genetic material as a target because it is more consistent than phenotypic characterization.^{12,14-16}

The present method can provide results in 24 hours compared with the 2 or 3 weeks that a culture takes to grow. This is in itself a significant advance regarding achieving a clinical diagnosis to begin suitable treatment at least 2 to 4 weeks sooner.

In this work, we sought to determine the viability of a PCR technique as an alternative method to traditional culture for the detection of dermatophyte fungi in nail samples. In the comparative study, we found first a coincidence of negativity with the two methods in 119 cases (52.9% of the total) of suspected onychomycosis. This means that most cases of apparent onychomycosis are actually

Table 1. Results of the Analysis of Samples by PCR and Plaque Culture

PCR	Culture		Total
	Negative	Positive	
Negative	119 (52.9)	33 (14.7)	152 (67.6)
Positive	16 (7.1)	57 (25.3)	73 (32.4)
Total	135 (60.0)	90 (40)	225 (100)

Note: Data are given as number (percentage).
Abbreviation: PCR, polymerase chain reaction.

dystrophies as a result of other pathologic conditions that are not caused by dermatophyte fungi, such as psoriasis. This fact confirms the need for improved differential diagnosis in onychodystrophies with new techniques that help clinical practice.

The results of the molecular and classical methods coincided in 78.2% of the samples analyzed, which places this technique close to other similar assays.^{12,18,19} The results were discordant in 21.8% of the cases. In 16 of these discordances, the analysis was positive for DNA amplification but not for culture. This was an expected result because of the theoretically higher sensitivity of the PCR to detect DNA in cases where the fungus is no longer viable but remains as genetic material in the sample.

However, we did not expect that in 33 samples the growth would happen on the plate culture while the DNA could not be amplified by PCR. This is an issue that needs further study to improve sensitivity. A possible explanation for this failure may lie in the fact that we used very small fragments of sample for DNA extraction, and some of the fragments had no copy or an insufficient amount of DNA. A partial solution to this problem is to make a duplicate of the extraction of the genetic material.

We must, however, study the sequence of these strains either to verify whether mutations exist regarding the consensus sequences used in the design of the primers or to confirm that they are atypical strains.^{16,20}

Although this PCR technique did not have greater sensitivity than the traditional culture method, we believe that a considerable advance in the laboratory has been achieved because in most cases—85.3% of the samples—we can shorten the wait time for test results. In only 14.7% of the cases do we have to wait to get a possible positive culture result when the PCR result is negative (Table 1).

We are sure that it is possible to improve this technique, and in the future a molecular method will be the definitive diagnostic method. At present,

however, culture growth on plates is indispensable to confirm detection of the 14.7% of samples that would be false-negatives with PCR.

Culture growth is still the reference method for the detection of dermatophyte infection in nails, mainly because it allows identification of the etiologic agent and the subsequent study of sensitivity to antifungal agents⁶; but, we can now compensate for the first disadvantage that is the long time that we have to wait to begin treatment in the case of fungal infection confirmation.

Conclusions

We conclude, then, that application of a PCR as a complementary technique to culture growth notably improved the diagnosis of onychodystrophies in a podiatric medical clinic, especially regarding reduction of time for confirmation of diagnosis.

Acknowledgment: We thank Silvia Rubio, María Carmen Ledesma, and the University Podiatric Clinic of Plasencia for recovery and reception of nail samples.

Financial Disclosure: This work was funded by the University of Extremadura.

Conflict of Interest: None reported.

References

1. WEITZMAN L, SUMMERBELL RC: The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev* **8**: 240, 1995.
2. MONZÓN DE LA TORRE A, CUENCA-ESTRELLA M, RODRÍGUEZ-TUDELA JL: Epidemiological survey of dermatophytosis in Spain (April-June 2001). *Enferm Infecc Microbiol Clin* **21**: 477, 2003.
3. FAERGEMANN J, BARAN R: Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. *Br J Dermatol* **149** (suppl 65): 1, 2003.
4. MARTINEZ ROIG A: "Micosis cutáneas," in *Protocolos diagnósticos y terapéuticos en Dermatología Pediátrica*, edited by FA Moraga Llop, p 65, Asociación Española de Pediatría, Madrid, 2003.
5. STIVENS DA: Diagnosis of fungal infections: current status. *J Antimicrob Chemother* **49** (suppl 1): 11, 2002.
6. PETRINI B, VON ROSEN ML: Optimal dermatophyte diagnosis requires both microscopy and culture. *Lakartidningen* **99**: 4084, 2002.
7. MAHONEY JM, BENNET J, OLSEN B: The diagnosis of onychomycosis. *Dermatol Clin* **21**: 463, 2003.
8. GADEA I, CUENCA-ESTRELLA M, MARTÍN E, ET AL: Procedimientos de diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **25**: 336, 2007.
9. ELEWSKI BE: Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis and management. *Clin Microbiol Rev* **11**: 415, 1998.
10. LOO DS: Cutaneous fungal infection in the elderly. *Dermatol Clin* **22**: 33, 2004.
11. BRILLOWSKA-DABROWSKA A, SAUNTE DM, ARENDRUP MC: Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *J Clin Microbiol* **45**: 1200, 2007.
12. BALAJEE SA, SIGLER L, BRANDT ME: DNA and the classical way: identification of medically important molds in the 21st century. *Med Mycol* **45**: 475, 2007.
13. LIU D, COLOE S, BAIRD R, ET AL: Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *J Med Microbiol* **49**: 493, 2000.
14. SHEHATA AS, MUKHETJEE PK, ABOULATTA HN, ET AL: Single-step PCR using (GACA)₄ primer: utility for rapid identification of dermatophyte species and strains. *J Clin Microbiol* **46**: 2641, 2008.
15. RODRÍGUEZ-TUDELA JL, CUESTA I, GÓMEZ-LÓPEZ A, ET AL: Molecular techniques in mycology. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **26** (suppl 13): 47, 2008.
16. YANG J, CHEN L, WANG L, ET AL: TrED: the *Trichophyton rubrum* Expression Database. *BMC Genomics* **8**: 250, 2007.
17. DENNING DW, EVANS EGV, KIBBLER CC, ET AL: Fungal nail disease: a guide to good practice (report of a Working Group of the British Society for Medical Mycology). *BMJ* **311**: 1277, 1995.
18. HAY RJ, JONES RM: New molecular tools in the diagnosis of superficial fungal infections. *Clin Dermatol* **28**: 190, 2010.
19. GUPTA AK, ZAMAN M, SINGH J: Fast and sensitive detection of *Trichophyton rubrum* DNA from the nail samples of patients with onychomycosis by a double-round polymerase chain reaction-based assay. *Br J Dermatol* **157**: 698, 2007.
20. GRÄSER Y, SCOTT J, SUMMERBELL R: The new species concept in dermatophytes: a polyphasic approach. *Mycopathologia* **166**: 239, 2008.

Puesta a punto de una PCR para mejorar la detección directa de Hongos en las uñas y de Hongos no dermatofitos.

Introducción.

En la actualidad, la infección micótica ungueal sigue siendo la patología ungueal de mayor prevalencia, pero en los últimos años se está experimentando una mayor incidencia de infección de la uña por levaduras, hongos no dermatofitos e infecciones mixtas. Este fenómeno es debido a un mayor incremento de individuos en estado de inmunodepresión (trasplantes de órganos, quimioterapia, corticoides y sida), diabetes, enfermedades vasculares periféricas, así como el uso y abuso de ciertos estilos de vida (piscinas, saunas, gimnasios) a lo que hay que añadir el gusto por las tendencias de moda en el calzado (zapatos oclusivos) ^{4 21 32 74}.

Basándonos en que existe un incremento de especies de hongos no dermatofitos como causantes de las infecciones ungueales, como *Cándidas*, *Microsporium incurvatum* o *Aspergillus sydowii*, y en los resultados obtenidos en el trabajo previo, nos propusimos mejorar la técnica de PCR, con el fin de intentar conseguir mayor sensibilidad y la identificación de otros hongos infectantes no dermatofitos.

Metodología.

Para llevar a cabo este estudio se recogió muestra de la lámina ungueal de 51 sujetos con sospecha de micosis ungueal en el dedo gordo del pie sin tratamiento previo, entre Noviembre de 2014 y Enero de 2015. Se respetaron los principios de la declaración de Helsinki y todos los sujetos dieron su conformidad por escrito. Estos sujetos acudieron a consulta a las dependencias de alguna de las siguientes clínicas de práctica privada: Clínica Universitaria de la Unex, Podoclínica Gallego Marcos y en la Clínica de Cristina Muñoz Velasco (ver la descripción de la población en la tabla 9).

	Edad Media (años)	DS (rango de edad)
Población (n=51)	65,96	±21,28 (16-95) años
Mujeres (n=29)	64,65	±19,88 (16-95) años
Hombres (n=22)	67,69	±23,37 (18-91) años

Tabla 9. Descripción de la población estudiada.

Cultivo Tradicional

En un primer lugar, un fragmento de las muestras, fue analizado mediante cultivo en el laboratorio del grupo de investigación DEDAP de la Universidad de Extremadura (Centro

Universitario de Plasencia, Cécere, España), siguiendo la metodología descrita en la página 28 de este trabajo.

A partir de otro fragmento de la misma uña se realizó la detección de infección micótica mediante esta técnica molecular, en las dependencias del grupo de investigación MMYRG de la Universidad de Coímbra (Portugal) de Febrero a Mayo del año 2016. En primer lugar se pesó el fragmento de uña sometido a estudio y posteriormente se hizo una extracción de ADN.

Protocolo de extracción de DNA a partir del fragmento de uña:

1. Colocamos en un tubo Eppendorf®: el fragmento de uña, MagNa Lyser Geen beads (ayudan a la ruptura de las estructuras), 200 µl de PBS 1X (NaCl 0.138M, KCl 0.0027M, pH 7.4 25°), 180 µl de Buffer ATL (Tissue Lysis Buffer de QIAGEN®) y 20 µl de Proteinkinasa (QIAGEN®). Homogenizamos.
2. Agitación en el MagNa Lyser® durante 1 minuto a 6000 r.p.m., posteriormente incubación de 1 minuto en hielo. Repetimos el proceso 2 veces más.
3. Añadimos 30 µl de Liticasa 1 mg/ml e incubamos durante 15 minutos a 37°C, luego 10 minutos a 65°C y finalmente 10 minutos a 95°C.
4. Cambiamos el sobrenadante a otro tubo Eppendorf®, añadimos 500 µl de Isopropanol Absoluto, agitamos suavemente e incubamos durante 10 minutos a temperatura ambiente).
5. Centrifugamos durante 15 minutos a 12000 r.p.m. y eliminamos el sobrenadante.
6. Añadimos 500 µl de Etanol al 70% a 4°C, centrifugamos durante 3 minutos a 12000 r.p.m. y eliminamos el sobrenadante exhaustiva y cuidadosamente, repetimos este paso. Y dejar evaporar el alcohol hasta que esté totalmente seco.
7. Resuspendemos en 30 µl de Agua y conservamos a -20°C.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Convencional.

Para realizar la PCR se utilizó un volumen final de reacción de 50 µl, compuesta por: 25 µl de Buffer Supreme NZYTaQ 2x Green Master Mix (laboratorios NZYTech, Lda.-Genes and Enzymes), 0.5 µl de cada oligonucleótido a 20µM, 1-5 µl de la solución de ADN y 19-23 µl de H₂O. Se utilizaron los primer universales para hongos ITS1 [5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'] y ITS4 [5' TCCTC CGCTTATTGATATGC 3'], que amplifica un fragmento específico del ADN ribosómico (18S) común a todos los hongos ⁷⁵.

Las condiciones de los ciclos de la PCR son: un primer ciclo de 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 60 segundos a 95°C, 60 segundos a 56°C, y 60 segundos a 72°C; finalmente un ciclo de 7 minutos a 72°C.

Los resultados fueron revelados mediante una electroforesis en un gel de agarosa 1.5%, teñido con Bromuro de Etidio, a 120V durante 30 minutos. Las bandas obtenidas se purificaron y se mandaron al servicio de secuenciación de AGOWA GmbH (Alemania).

Reacción en cadena de la polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR) (Real Time).

Posteriormente, en aquellos casos en los que la PCR convencional nos dio resultado negativo, se realizó una RT-PCR a partir de la misma solución de ADN. En la que se utilizó un volumen final de reacción de 20 µl, compuesta por: 4 µl de Buffer SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™), 0.8 µl de cada oligonucleótido a 20µM, 2-5 µl de la solución de ADN y 9.4-12.4 µl de H₂O. Se utilizaron los mismos primer universales para hongos ITS1 [5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'] y ITS4 [5' TCCTC CGCTTATTGATATGC 3'].

Las condiciones de los ciclos de la PCR son: un primer ciclo de 10 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de 10 segundos a 95°C, 5 segundos a 56°C, y 24 segundos a 72°C; a continuación, una curva de fusión con un ciclo dando tasa de transición lineal de 0,1°C / segundo durante 1 minuto a 65 ° C adquisición de fluorescencia continua y, finalmente, la reacción se finalizó con enfriamiento 1 ciclo a 40°C durante 30 segundos.

Los resultados positivos fueron revelados mediante una electroforesis en un gel de garosa 1.5%, teñido con Bromuro de Etidio, a 120V durante 30 minutos. Las bandas obtenidas se purificaron y se mandaron al servicio de secuenciación de AGOWA GmbH (Alemania).

Observación directa con microscopia confocal.

En aquellas muestras en las que los resultados fueron discordantes se tiñeron y se hizo una observación directa al microscopio confocal "microscope Axio Imager 2 Zeiss" del Instituto de Neurociencias y Biología Celular (CNC) de la Universidad de Coimbra (Portugal). Para poder proceder a la visualización de la muestra, en un primer lugar se desintegro la uña con una solución de KOH al 50% hasta su total disolución, posteriormente se tiñe las estructuras con Evans Blue + calcofluor durante 15-20 min.

Resultados.

En primer lugar, se hicieron las lecturas de los resultados obtenidos por el cultivo tradicional, en la que obtuvimos en el 76.5% (n=39) resultado positivo, de los cuales en 19 de los casos (48.8% de los positivos) los agentes infectantes eran dermatofitos, en 10 casos (25.6% de los positivos) se observó la presencia de Levaduras, y las 10 muestras restantes (25.6% de los positivos) fueron cultivos mixtos.

Los resultados del análisis molecular son obtenidos a partir de 5.7 ± 5.8 mg de uña, de los que se obtuvo una media de 115.54 ng/ μ l de ADN y una Absorbancia 260/280 de 1.65 ± 1.68 de media, según el protocolo descrito en el apartado de material y métodos. Posteriormente, se realizó la PCR convencional a todas las muestras con los Primer ITS y ITS4 (ver figura 24), cumpliendo las condiciones descritas en el apartado anterior. Mediante este análisis obtuvimos resultados positivos en el 58.8% (n=30) y negativos en el 41.2% (n=21). A continuación, a las 21 muestras que dieron resultado negativo se les realiza la PCR en Tiempo Real (ver figura 25), según las condiciones descritas en el apartado de metodología, y obtuvimos resultados positivos en el 61.9% (n=13) y negativos en el 38.1% (n=8) de los casos. Considerando la suma de las dos PCR como una sola técnica de diagnóstico, obtenemos resultados positivos en el 84.3% (n=43) y negativos en el 15.7% (n=8).

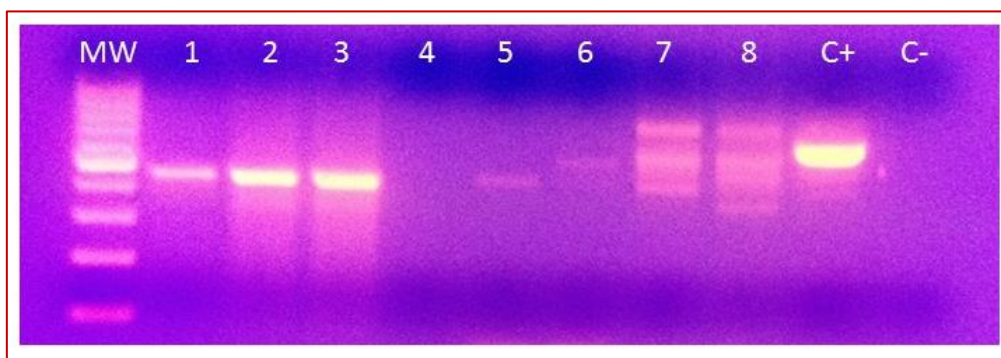


Figura 24. Revelado de los resultados mediante electroforesis en gel de agarosa, del material obtenido de la PCR convencional con los Primer ITS y ITS4. MW es el marcador de peso molecular, (C-) el control negativo y (C+) el control positivo. En las líneas 1, 2, 3 y 5 observamos resultado positivo a dermatofito, en la línea 4 un resultado negativo, en la línea 6 resultado positivo a levadura, mientras que en las líneas 7 y 8 observamos resultados mixtos (dermatofito y levadura)

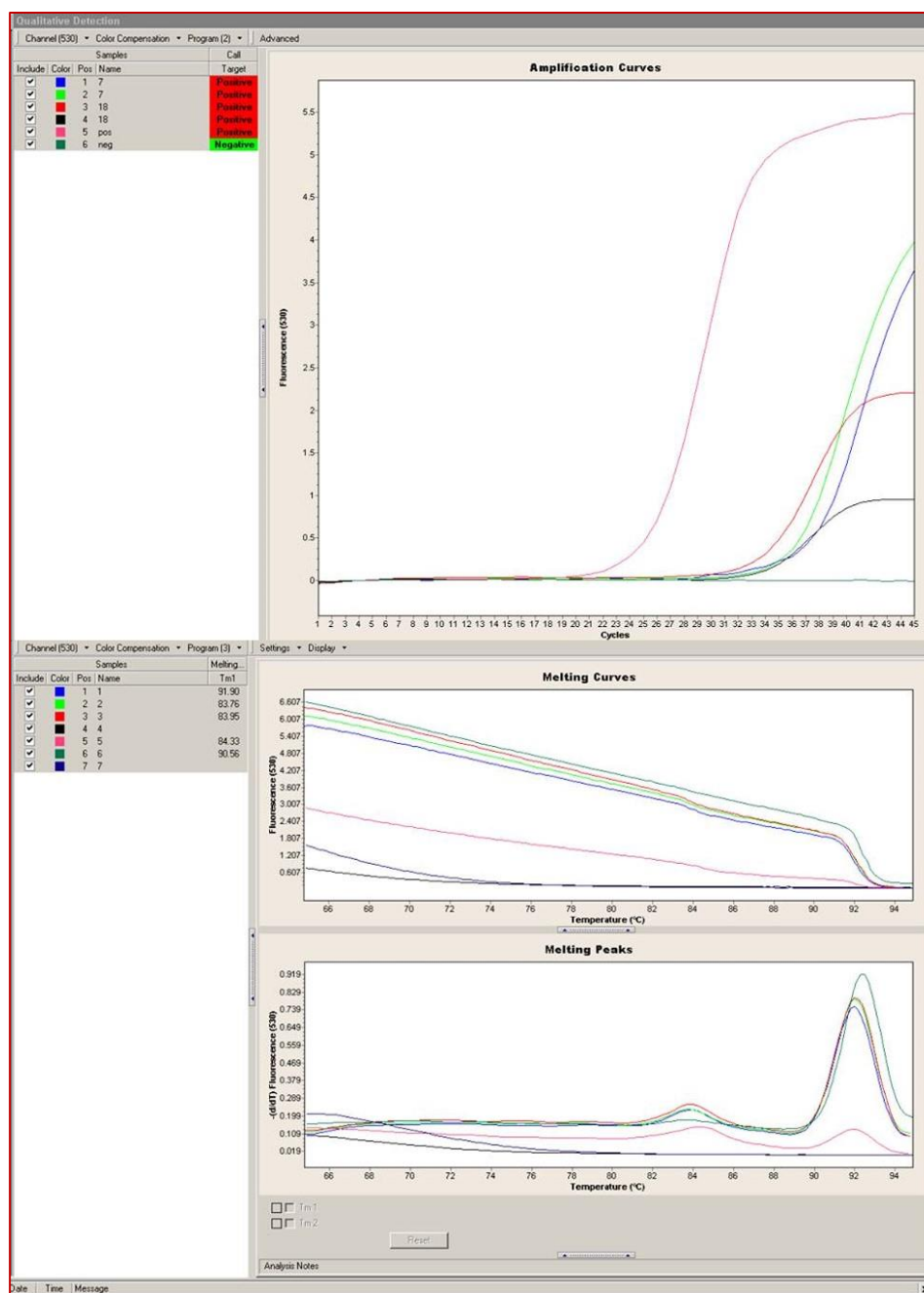


Figura 25. Gráficas obtenidas con la RT-PCR usando los Primer ITS y ITS4. Se representan los resultados de 7 muestras, de las cuales los números 6 y 7 se corresponden con los controles positivo y negativo respectivamente, usados para validar la técnica. Los resultados obtenidos son positivos en cinco casos (muestra 1, 2, 3, 5 y control positivo) y negativo en las muestra 4 y el control negativo.

Al comparar los resultados obtenidos entre los dos métodos utilizados en este estudio para el diagnóstico de onicomicosis, observamos que existe una concordancia del 76.5% entre los dos métodos (n=39), y una discordancia del 23.5% de los resultados (n=12), en los que en 4 muestras se detectaron hongos solo mediante el cultivo tradicional y en 8 solo mediante las técnicas de PCR (ver tabla 10). Estos resultados fueron sometidos al estudio estadístico, para su comparación, mediante el test McNemar con el que obtuvimos una $p=0.388$, lo cual nos

dice que ambos métodos (PCR y Cultivo) son igualmente efectivos en la detección de los microorganismos.

METODO	Positivos	negativos	Discordante	Concordante
Cultivo y/o PCR	92.2%(47)	7.8%(4)	23.5%(12)	76.5(39)
<i>Cultivo</i>	76.5% (39)	23.5%(12)	(*)7.8%(4)	-
<i>PCR</i>	84.3% (43)	15.7% (n=8).	(*)15.7%(8)	-

Tabla 10. Comparación de los resultados obtenidos por los dos métodos. (*)Hace referencia a resultados positivos detectados solo por una técnica.

Por otro lado, de las 43 (84.3%) muestras analizadas y que dieron presencia de hongos con la técnica de PCR, solo se obtuvo material suficiente o de calidad para la secuenciación de 36 de ellas (83.7% de las positivas). En 25 de estas muestras (58.2% de las positivas) se detectaron infecciones mixtas y se identificaron 27 tipos de hongos diferentes (ver tabla 11).

	Frecuencia		Frecuencia
<i>Candida parasilosis</i>	5	<i>Candida lipolytica</i>	1
<i>Candida sake</i>	5	<i>Candida sp</i>	1
<i>T. interdigitale</i>	4	<i>Cladosporium herbarum</i>	1
<i>Aspergillus sydowii</i>	2	<i>Derbarymyces hansenii</i>	1
<i>Cryptococcus diffluens</i>	2	<i>Flocosum sp</i>	1
<i>Epicoccum nigrum</i>	2	<i>Microsporium incurvatum</i>	1
<i>Kazachstania sp</i>	2	<i>Penicillium carneum strain</i>	1
<i>Pichia fermentus</i>	2	<i>Phoma herbarum</i>	1
<i>Rodotorula mucilaginosa</i>	2	<i>Pichia membranaefaciens</i>	1
<i>T. rubrum</i>	2	<i>Pichia sp</i>	1
<i>Aspergillus flavus</i>	1	<i>Trichosporon asahii</i>	1
<i>Aspergillus ruber</i>	1	<i>Trichosporon dermatis</i>	1
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	<i>Yarrowia lipolytica</i>	1
<i>Candida deformans</i>	1		
Total		45	

Tabla 11. Frecuencia de los diferentes agentes infectantes secuenciados.

Por último algunas de las muestras fueron observadas con el microscopio confocal.

En un primer lugar se observaron 3 muestras que en los resultados anteriores había concordancia en los resultados con ambas técnicas, es decir, se seleccionó una muestra en la que se detectó levaduras por ambas técnicas, otra en la que se detectó un dermatofito y por último una muestra con resultado mixto. Los resultados coinciden con los observados en el microscopio (ver figuras 26 y 27).

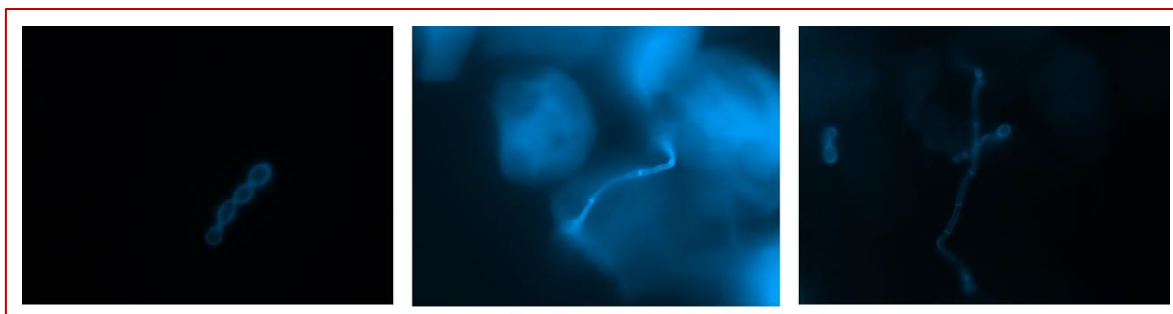


Figura 26. Observaciones directas de las muestras teñidas con Evans Blue + calcofluor al microscopio imager 2 de Zeiss con el objetivo 10X con filtro. En la izquierda podemos observar la presencia de levaduras, en la imagen central se observa un dermatofito y en la de la derecha observamos presencia de levadura y dermatofitos.

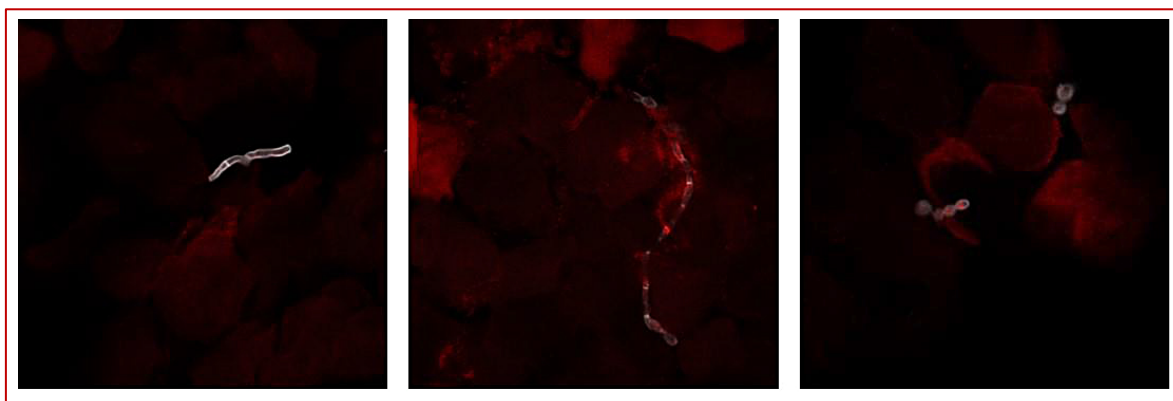


Figura 27. Observaciones directas de las muestras teñidas con Evans Blue + calcofluor al microscopio imager 2 de Zeiss con el objetivo 10X, con dos filtros. En la imagen de la izquierda y central podemos observar queratinocitos con dermatofitos, mientras que en la de la derecha observamos presencia de levaduras.

Posteriormente, nos centramos en la observación de las 4 muestras que el cultivo dan positivo (en dos casos levaduras y en dos casos dermatofitos) y el resultado de las PCR son negativos. El análisis molecular de estas muestras son obtenidos a partir de 10.81 ± 7.33 mg de uña, de los que se obtuvo una media de 276 ± 304.74 ng/ μ l de ADN y una Absorbancia 260/280 de 1.3 ± 0.11 de media. En el estudio microscópico confirmamos la presencia de los agentes infectantes correspondientes.

Discusión.

Los métodos moleculares son una base sólida de las pruebas diagnósticas en la práctica clínica médica actual, ya que renuevan el concepto de diagnóstico, además de la constante y continua puesta en marcha de los métodos diagnósticos clínicos en general, y en concreto en la detección de hongos ^{62 63}.

Con la aplicación de estas técnicas para el diagnóstico de onicomicosis conseguimos disminuir de forma considerable el tiempo de diagnóstico de 4 semanas a unas horas ^{49 51}. Mediante el

presente trabajo hemos comparado el diagnóstico mediante los dos métodos, con el fin de ver si es viable el diagnóstico de estas patologías mediante la PCR. Los resultados concuerdan en el 76.5% (n=39), resultados semejantes a los obtenidos por otros trabajos ^{60 76 77} y por los que hemos obtenido con el anterior trabajo ⁶⁵. En el 68,62% (n=35) coinciden los resultados positivos y 7.8% (n=4) en los resultados negativos. Esto hace referencia a que la alteración observada en la uña no es causada por infección en el 7.8%, datos que no coinciden con las incidencias descritas. En la literatura se describe que cerca del 50% de las patologías ungueales son causadas por la micosis ⁴, esta diferencia, en este caso, puede ser debido a experiencia en el abordaje de esta patologías por el profesional que duda del diagnóstico ^{78 79}.

Podemos afirmar que mediante la técnica de PCR se detecta la infección en el 84.3% (n=43) de los casos y que la sensibilidad es mayor que con el cultivo. Era de esperar, debido a la sensibilidad de la prueba y que el cultivo fracasa en el 40% de su resultados ⁴⁹. Sin embargo, que en 4 de los casos se detectaran hongos por el cultivo y no por la PCR, no era esperado. Por este motivo nos centramos en la observación directa al microscopio confocal, donde se confirmó la presencia de hongos. Este resultado puede ser debido a que la PCR se inhibiera porque estas muestras se obtuvieron a partir de mucha cantidad de uña (10.81 ± 7.33 mg), por lo cual partimos de mucho ADN (276 ± 304.74 ng/ μ l), y porque éste contenía muchas impurezas (Absorbancia 260/280 de 1.3 ± 0.11 de media)⁸⁰. Pero a pesar de que encontremos una discordancia en los resultados, la estadística demuestra que no existe diferencia entre los resultados obtenidos por ambos métodos, de esta manera la PCR utilizada obtiene los mismos resultados que el método de referencia.

A pesar de que se describe que el principal causante de la onicomycosis es el *Trichophyton Rubrum* ²³, existen ciertos grupos poblacionales ya descritos anteriormente (personas con inmunodepresión sobre todo) o estilos de vida que hacen que sean más incidentes otros hongos ^{4 21 32}. Por tanto los resultados obtenidos de la secuenciación eran esperados, además la mayoría de los sujetos son de avanzada edad (65.96 ± 21.28 años), viven en zonas rurales con hábitos cotidianos de agricultura y ganadería, y varios sujetos de menor edad son inmunodeprimidos (VIH, leucemia y trasplante renal).

Conclusiones.

Tras el análisis de los resultados obtenidos, concluimos que la técnica de PCR utilizada mejora notablemente el diagnóstico de la onicomycosis, especialmente en cuanto a la reducción del tiempo para la confirmación del diagnóstico y en la especificidad de la detección del agente infectante.

2. Diagnóstico de la Psoriasis ungueal mediante técnicas de inmunoensayo.

Cuantificación de β -Defensina 2 plasmáticas para la detección de la Psoriasis ungueal

Introducción.

A la vista de los resultados obtenidos y expuestos en los capítulos anteriores, en los que existe un porcentaje de onicopatías de origen no fúngico, nos planteamos la necesidad de mejorar el diagnóstico diferencial entre las onicopatías en general, y profundizar en las patologías ungueales no micóticas. Especialmente en el caso de la Psoriasis, que es la segunda patología más prevalente en estas distrofias ⁴⁵.

La onicodistrofia está presente de forma crónica en el 50 % de los sujetos que sufren Psoriasis ⁸, siendo en el 10% la única sintomatología de la enfermedad ^{81 82}.

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria con un alto componente genético en su etiología ^{35 36 37}. Se han identificado al menos nueve sitios cromosómicos de sensibilidad a psoriasis ²⁹. La asociación de la enfermedad con el gen HLA-Cw6 y con IL12B, IL-17A e IL23R proporcionan una evidencia para el carácter autoinmune de la enfermedad ^{83 84}.

Recientemente, se ha encontrado que los queratinocitos de las placas psoriásicas secretan notables cantidades de β -defensina, péptidos con actividad antimicrobiana, antifúngica y antivírica. Estos péptidos están codificados por los genes *DEFB* que están presentes en el cromosoma 20 y en el 8p23.1, que contiene 8 genes de β -defensinas, siete de los cuales están repetidos en un número variable de copias. Se ha probado la asociación de un alto número de copias de este gen *DEFB4* cromosómico con la aparición de psoriasis ^{85 86 87}.

Una de las proteínas (β -defensina 2 ó hBD-2) codificada por el gen *DEFB4*, no se expresa en piel normal, pero sí en las placas de piel con psoriasis. Esta puede detectarse en una biopsia de piel o en plasma sanguíneo ^{83 84 86 87 88}.

Esta es la base de nuestro objetivo, cuantificar los niveles de β -defensina 2 en aquellos sujetos que presentaban onicopotía y no se detectó la infección fúngica previa. Y de esta forma mejorar el diagnóstico diferencial entre las onicopatías, en concreto la Psoriasis, basado en pruebas de laboratorio poco invasivas.

Metodología.

Para llevar a cabo este estudio transversal descriptivo; durante los años 2012 y 2013 se realizó la recogida de muestras de uñas y sangre, en las dependencias de la Clínica Podológica Universitaria de la Universidad de Extremadura, a aquellos pacientes que presenten alteraciones ungueales. Se eligieron aquellos pacientes que en nuestra base de datos constaban con resultados previos negativos para el cultivo de hongos, y pacientes con psoriasis diagnosticada, los cuales fueron informados y dieron su aprobación con la firma del consentimiento informado. En todo momento se han respetado los principios de la declaración de Helsinki y se solicitó la aprobación correspondiente al comité de bioética de la Universidad de Extremadura.

Se recogieron muestras a 48 sujetos, de los cuales 16 tenían diagnosticada previamente psoriasis y 32 presentaban alteración ungueal sin presencia fúngica (ver tabla 12).

	Edad Media (años)	DS (rango de edad)
Población Total (n=48)	54.56	± 17.71 (10-81) años
<i>Mujeres (n=33)</i>	53.73	± 15.24 (23-81) años
<i>Hombres (n=15)</i>	56.40	± 22.74 (10-81) años
Psoriasis diag. (n=16)	47.21	± 11.31 (30-77) años
<i>Mujeres (n=9)</i>	45.11	± 8.75 (30-56) años
<i>Hombres (n=7)</i>	49.7	± 15.25 (35-77) años
Sospecha Pso.(n=32)	58.28	± 19.26 (10-81) años
<i>Mujeres (n=24)</i>	56.95	± 16.01 (23-81) años
<i>Hombres (n=7)</i>	62.25	± 27.87 (10-81) años

Tabla 12. Descripción de la población estudiada.

Cuantificación de la β -defensina 2 en plasma.

Para cuantificar las β -defensina se tomó una muestra de 2 ml de sangre entera a todos los pacientes. Los tubos de recogida de muestra tenían EDTA (K2E) como anticoagulante. Se centrifugaron a 2500 rpm durante 3,5 minutos. Con ayuda de una pipeta se recogió el plasma y se conservó a -20° hasta tener muestras suficientes para procesar las mismas.

La determinación de la concentración de β -defensinas se llevó a cabo mediante una técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) con el kit comercial: "Defensin 2, beta (Human) - ELISA Kit" de PHOENIX PHARMACEUTICALS, INC", siguiendo las instrucciones indicadas

por el fabricante. Se basa en la captura e inmovilización, mediante Anticuerpos anti-HBD-2, de las proteínas presentes en la sangre. Una vez capturadas se les añadirán el anticuerpo biotinilado, la estreptavidina – peroxidasa y una solución sustrato que le da color, cuya intensidad será directamente proporcional a la concentración de las β -defensina 2. Y mediante diluciones seriadas de una solución de concentración conocida, nos permite obtener una curva standar para extrapolar las concentraciones correspondientes a los valores de absorbancia determinados.

La representación en escala logarítmica de los valores de la curva nos proporciona una recta y mediante la regresión lineal determinamos los valores de las concentraciones de las distintas muestras a partir de su absorbancia a 450nm.

Una vez obtenidos los resultados y basándonos en el trabajo realizado por Hollox EJ et al. 2008 ⁸⁵ y por Jansen PAM et al. 2009 ⁸⁶, que cuantificaron los niveles en pacientes con psoriasis, consideramos que los pacientes con niveles superiores a 380 μ g/ml de β -defensina 2 padecen Psoriasis.

Cultivo tradicional

Para llevar a cabo este análisis se llevaron a cabo las pautas descritas en la página 28 de este trabajo, donde se describe el procesamiento del cultivo microbiológico en Agar Sabouraud con cloranfenicol para cultivar hongos.

Todos los resultados fueron sometidos a estudios estadísticos, que se realizaron mediante el programa SPSS 15.0, fijándose la significación estadística en el 5% ($p < 0.05$).

Resultados.

Tras someter las muestras problema y las muestras patrón con sus correspondientes controles positivos y negativos por duplicado, al test ELISA descrito en anteriormente, obtuvimos una placa con distintas intensidades de color amarillo (ver figura 28), que fueron medidas en un espectrofotómetro. Éste tradujo la intensidad de color en Absorbancia a una luz de 450 nm.

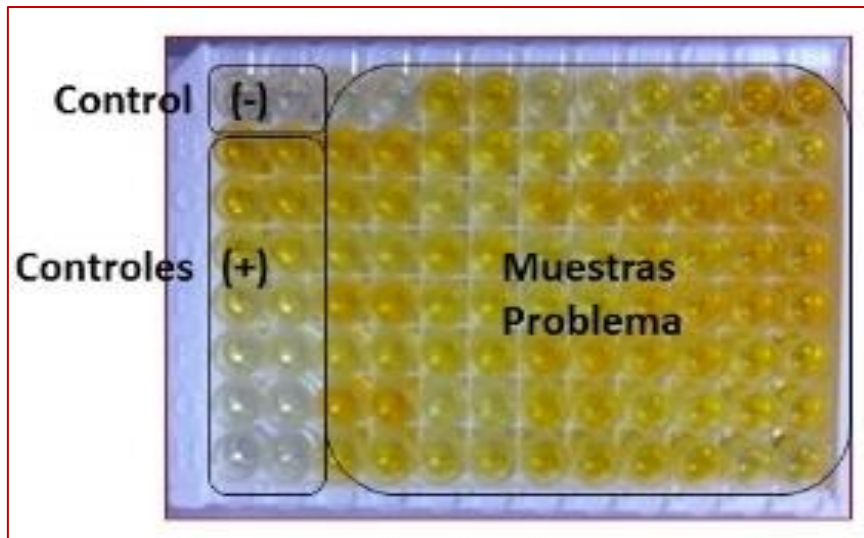


Figura 28. Placa multipocillo del kit comercial: “Defensin 2, beta (Human) - ELISA Kit” de PHOENIX PHARMACEUTICALS, INC”, tras la captura e inmovilización, mediante Anticuerpos anti-HBD-2, de las proteínas presentes en la sangre. Marcadas con anticuerpo biotinilado, la estreptavidina – peroxidasa y una solución sustrato que le da color amarillo, cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de las β -defensina 2.

Los resultados obtenidos de las muestras de concentración conocida de los péptidos, nos permiten obtener una curva que relaciona la Absorbancia con la concentración de proteínas (ver figura 29-A). Mediante la regresión lineal de estos datos, podemos obtener la ecuación de una recta (ver figura 29-B) que nos permite obtener los valores de las concentraciones de las distintas muestras a partir de su absorbancia a 450nm.

$$C = (A_{450nm} - 0,0047) / 0,2693$$

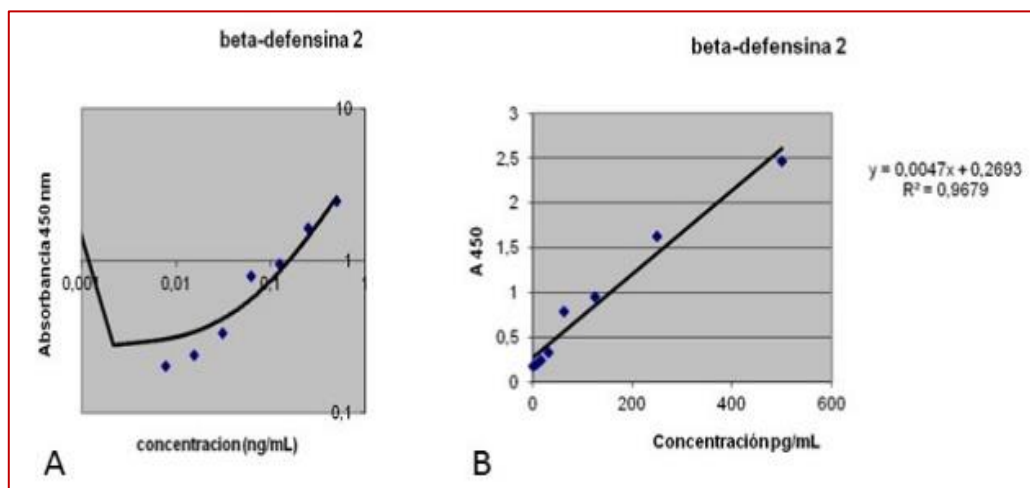


Figura 29. A) Relación entre la Absorbancia a 450nm frente a la concentración de β -defensinas 2 en plasma. B) Regresión lineal de los mismos valores y ecuación de la recta obtenida.

Pudimos determinar la concentración de β -defensina en un total de 48 muestras (ver tabla 13), de las cuales 16 pertenecían a pacientes con un diagnóstico previo de psoriasis, y el resto, 32, personas con alguna patología ungueal de origen desconocido.

En primer lugar, encontramos niveles muy bajos de estas proteínas en 2 sujetos con Psoriasis diagnosticada que estaban en remisión de la enfermedad.

Por otro lado, de los 32 muestras problema, 17 presentaron niveles elevados de péptidos, que se correspondería con 17 casos cuyo origen sería una psoriasis sin diagnosticar, los cuales serían derivados al dermatólogo para un posible seguimiento de la enfermedad.

Por último, de total de 48 muestras, un 31 %, presenta niveles bajos de β -defensina, por tanto, consideramos que su patología sería imputable a otras causas diferentes a la psoriasis, y que requerirían otras pruebas complementarias para un diagnóstico certero.

	Niveles BD2 >380 $\mu\text{g/ml}$ % (n)	Niveles BD2 <380 $\mu\text{g/ml}$ % (n)
Población Total (n=48)	64.58 (31)	35.42 (17)
Psoriaticos (n=16)	87.5 (14)	12.5 (2)
Sospecha Pso (n=32)	53.13 (17)	46.87 (15)

Tabla 13. Resultados de los niveles de β -defensina 2 (BD2) en $\mu\text{g/ml}$ detectados en los sujetos estudiados

Dado que las defensinas son péptidos con propiedades antimicrobianas, quisimos comprobar si existía una relación entre los niveles altos de β -defensina 2 y baja incidencia de infección fúngica en las uñas.

Para ello, sometimos a cultivo las uñas recogidas en esta muestra. Obtuvimos resultados en 42 de las 48 uñas. Fueron positivas el 59.52% (n=25) de los casos. De los cuales 7 casos corresponden a sujetos con niveles inferiores a 380 $\mu\text{g/ml}$ de β -defensina 2, y 18 presentaron niveles superiores a 380 $\mu\text{g/ml}$ de β -defensina 2 (ver tabla 14). En los 25 casos con cultivo positivo se detectó la presencia de dermatofitos en el 52% (n=13) y de levaduras en el 48% (n=12).

En 17 casos el cultivo fue negativo, 10 de ellos con niveles altos de β -defensina 2 y 7 con niveles bajos.

	Cultivo Positivo % (n)	Cultivo Negativo % (n)
Población Total (n=42)	59.52 (25)	40.48 (17)
Sujetos con Niveles BD2* >380 µg/ml (n=25)	72.00 (18)	28.00 (7)
Sujetos con Niveles BD2* <380 µg/ml (n=17)	41.18 (7)	28.82 (10)

Tabla 14. Resultados de los de los cultivos para la detección de hongos en los sujetos estudiados.* β -Defensina 2.

Discusión.

La psoriasis ungueal es la segunda patología más frecuente que afecta a las uñas ⁴⁵, con una incidencia de hasta el 90% de los individuos que padecen psoriasis. En la actualidad el diagnóstico de esta patología se hace de forma clínica, a pesar de tener la opción de realizar una la biopsia para su confirmación. La biopsia no se lleva a cabo frecuentemente porque puede causar malformaciones secundarias en las uñas que aumentarían la comorbilidad de la patología ^{8 35 37}.

Se necesitan, por tanto, pruebas menos invasivas que confirmen esta segunda posibilidad ante una onicopatía.

En un primer momento quisimos utilizar una técnica como la PCR para detectar los genes característicos de la psoriasis, pero la complejidad genética de esta enfermedad, y el poco número de células accesibles para ello, hizo fracasar este intento.

Sin embargo, la técnica que hemos utilizado para detectar la β -defensina 2 es sencilla, rápida, y poco invasiva.

En nuestros resultados hemos detectado psoriasis en 17 casos que no manifestaban las lesiones eritrodescamativas de la piel típicas de la enfermedad. Basándonos en estos resultados y en que además en el 10% de estos enfermos, su primera manifestación es a nivel ungueal ⁴³, podemos afirmar que mediante la exploración clínica de la uña con sospecha de esta enfermedad y la realización de la determinación cuantitativa en plasma de β -Defensina 2 podríamos diagnosticar la psoriasis con una alta probabilidad.

Los resultados de los cultivos no eran los esperados ya que previamente habían sido negativos en todos los casos que no tenían diagnosticada la psoriasis. Estos resultados podrían ser debidos a una degeneración que la lámina ungueal producida por la enfermedad en el tiempo transcurrido entre ambos análisis, facilitando de esta forma la invasión de los hongos ^{44 45}.

Centrándonos en los sujetos con los niveles de β -Defensina 2 mayor a 380 $\mu\text{g/ml}$, los cultivos en ellos fueron positivos en el 72% de los casos ($n=18$). Estos datos concuerdan con los descritos en la bibliografía, en los que se exponen que la mayoría de los sujetos con psoriasis ungueal padecen una onicomicosis asociada ^{44 45}.

Respecto a los resultados sobre los agentes causantes de la infección no hay diferencia entre la incidencia de los dermatofitos y las levaduras, lo que corrobora que existen ciertos grupos poblacionales o estilos de vida que hacen que sean más frecuentes otros hongos no dermatofitos ^{4 21 32}.

Conclusiones.

La detección de β -Defensinas 2 en plasma es una técnica poco invasiva, rápida y sencilla con la que podríamos diagnosticar psoriasis.

Sin embargo, parece que altos niveles de beta-defensina 2 no protegen frente a la infección fúngica de la uña.

VI. Tratamiento láser de las alteraciones ungueales de origen micótico e idiopático. Estudio de la eficacia.

1. Introducción al tratamiento láser.

Como hemos comentado en el capítulo anterior, la patología ungueal puede limitar las actividades cotidianas, sumándole un gran impacto psicosocial que hace que los pacientes que las sufren demanden tratamientos rápidos y sencillos^{2 3 4}.

Para la resolución de estas alteraciones es imprescindible la elección de un tratamiento adecuado además de la higiene, la autonomía y la constancia del paciente, ya que la mayoría de los tratamientos son de larga duración, lo que supone una alta frecuencia de abandono de los mismos^{2 3 23}.

Y con el fin de satisfacer esta demanda de tratamientos más rápidos, sencillos y eficaces, en los últimos años se han realizado numerosos trabajos que han aportado avances en la aplicación del láser en la patología ungueal^{89 90}. Cuando aplicamos la luz láser sobre los tejidos, en general se producen una serie de efectos basados en el principio de fototermólisis que describieron en 1983 Anderson y Parrish. Esta teoría describe que la energía aplicada con láser es selectiva para una molécula diana, cromóforo, la cual no produce daño tanto en el tejido aplicado como en el tejido adyacente. Y Los principales cromóforos son melanina, hemoglobina y agua (ver figura 30)^{91 92}.

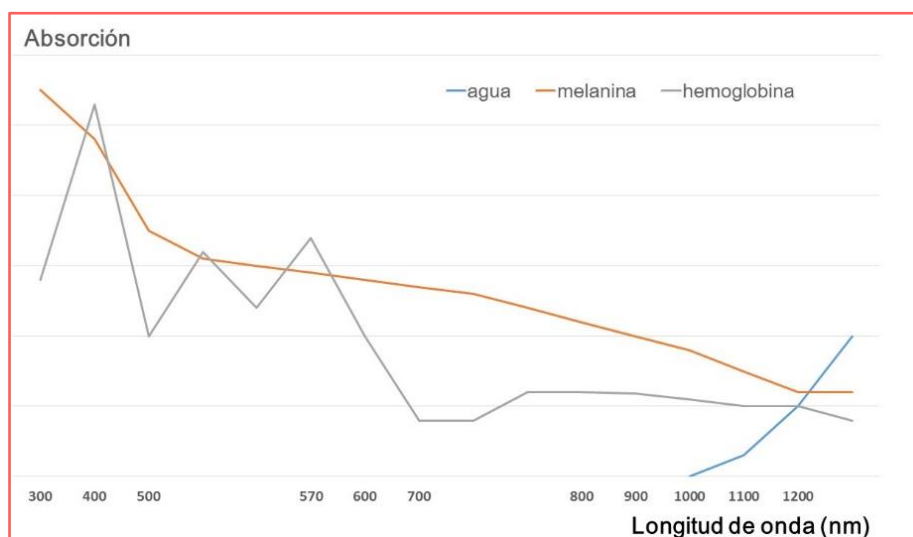


Figura 30. Curvas de absorción de los principales cromóforos. Adaptado de "González-Rodríguez a. J, Lorente-Gual R. Current indications and new applications of intense pulsed light. Actas Dermosifiliogr. 2015; 106(5):350-364."

Mediante la aplicación del láser sobre la piel producimos un efecto térmico, bioeléctrico, mecánico y bioquímico, consiguiendo un efecto fotoquímico en longitudes de ondas inferiores a 350-450 nm y un efecto térmico a longitudes de onda mayores. Mediante estos mecanismos de acción logramos procesos antiinflamatorios, antiálgicos y bioestimulantes en los tejidos tratados ⁹³.

Esto hace que exista una gran heterogeneidad de tratamientos para la resolución de las alteraciones ungueales, relativamente sencillos y de rápida aplicación, que a su vez ha hecho que se abaraten los costes de adquisición de gran variedad de equipos. En estos estudios se han obtenido resultados prometedores, pero en algunos casos con falta de evidencia científica. ^{89 90 94}.

2. Aplicación del láser Nd:YAG 1064nm en alteraciones ungueales.

Estudio de la eficacia del tratamiento láser en onicomicosis.

Introducción.

En los últimos años se han realizado numerosos trabajos en los que se ha estudiado el tratamiento de la onicomicosis con el láser de 1064 nm ⁸⁹. El mecanismo de acción del láser realmente es desconocido ⁹⁵, pero se estima que la luz emitida por el láser llega hasta el lecho ungueal, traspasando la lámina. Durante su recorrido los hongos, debido a su pigmentación, absorben esta energía que se transforma en calor. Esta exposición del hongo a altas temperaturas conduce a la destrucción, tanto del propio hongo como de las esporas producidas por el ⁹⁶. Este tipo de tratamiento se elige principalmente por su rapidez.

Existen pocas evidencias en cuanto a la eficacia de estos métodos para la eliminación del hongo en las uñas. Los estudios revisados presentan conclusiones muy diferentes en cuanto a los resultados de los tratamientos, sobre todo entre los que se realizaron con un seguimiento a corto o a largo plazo ⁸⁹.

Por ello, nuestro propósito en este trabajo es comprobar la eficacia de la aplicación de la radiación láser en el tratamiento de la onicomicosis, en sujetos con infección diagnosticada.

Metodología.

El presente trabajo cuenta con la aprobación del Comité de Bioética de la Universidad de Extremadura. Se trata de un ensayo clínico, analítico, observacional, longitudinal prospectivo y no aleatorizado. Para ello se realizó el cultivo de la lámina ungueal de 140 sujetos con sospecha de micosis ungueal en el dedo gordo del pie y se realizó el tratamiento en aquellos sujetos que dieron positivo. Se respetaron los principios de la declaración de Helsinki y todos los sujetos dieron su conformidad por escrito. Los sujetos acudieron a consulta en las dependencias de alguna de las siguientes clínicas de práctica privada: Clínica Universitaria de la Unex, Clínica del Pie Eva Luengo Celador, Podoclínica Gallego Marcos y en la Clínica de Manuela Hernández.

Recogida de la muestra.

Para que la muestra tenga una mayor viabilidad y disminuir las posibles variantes distorsionantes, la recogida de muestra cumplió el siguiente protocolo:

- Son válidos tanto trozos de uña como polvo. Preferiblemente las dos cosas. Pero siempre de la parte activa de la lesión.
- Un buen etiquetado de la muestra que se corresponda con los datos de la hoja de recogida.
- Es necesario que la recogida de la muestra guarde, en la medida de lo posible, la asepsia. Para ello se desinfecta la zona con alcohol y se deja secar al aire, recogiendo la muestra en un recipiente estéril.
- La recogida de la muestra se realiza con distintos materiales; los más comunes son: bisturí, fresa, tijeras, cepillo, pero siempre material estéril para evitar contaminaciones.
- Se envía al laboratorio lo antes posible para su siembra inmediata. La muestra se recoge antes de la instauración de cualquier tratamiento.
- En los casos en que la muestra no se traslade de inmediato al laboratorio después de la recogida, se conserva entre 15 y 30°C.

En los casos en los que el sujeto estuviera tratándose con antifúngicos la onicomiosis, se cesó dicho tratamiento 30 días antes de tomar la muestra para analizarla (n=8).

Análisis de las muestras.

Las muestras fueron analizadas mediante cultivo tradicional en la Unidad de Diagnóstico de la Clínica Podológica Universitaria de la Universidad de Extremadura que gestiona el grupo de investigación DEDAP. Siguiendo la metodología descrita en la página 28 de este trabajo.

Aplicación del láser Nd:YAG 1064nm

Se aplicó el tratamiento en aquellos sujetos que previamente habían sido diagnosticado de onicomycosis en al menos una uña del pie. Para el tratamiento con láser se utilizó el Equipo PinPointe Footlaser™ cedido por Cynoure® España. Las características técnicas del equipo se reflejan en la tabla 15. El fabricante describe que cada vez que se aplica un pulso con PinPointe Footlaser™ aplican 10 micropulsos en unos 0.5 segundo, con un intervalo entre micropulsos de 0.05 segundos. Con esto se consigue que los vasos capilares se enfríen reduciendo las molestias del paciente y los posibles daños en tejidos sanos. Con la aplicación de 10 micropulsos se aplica 20 J/cm² en 100 microsegundos o 200 J/cm² para cada spot de tratamiento.

Tipo de láser	Class IIIb
Longitud de onda	1064 nm
Energía Pulso (max)	200 µj
Ancho de pulso (max)	100 µs
Tasa de repetición (max)	30 Hz
Selección de 3 programas	3 ajustes fijos
Fibra	
Luz guía	
Longitud de onda	630 a 680 nm
Potencia	
Temporizador cuenta atrás	
Requisitos eléctricos	120V /60Hz /8A
Tamaño	810. x 35 x 35.5 cm
Peso	17.2 Kg

Tabla 15. Características técnicas del PinPointe Footlaser™.

Se siguieron las siguientes pautas, tal y como nos indicó el fabricante:

1. Se trataron con PinPointe Footlaser™ todas la uñas del pie o pies afectados, estuvieran o no infectadas por hongos. Con previo desbridamiento de la parte lesionada.
2. Se aplicaron dos barridos con PinPointe Footlaser™ por uña, abarcando también los tejidos periungueales. En un primer lugar se hizo un barrido con el láser longitudinal a la uña. Posteriormente un barrido transversal a la uñas (ver figura 31).
3. A los 30 y a los 90 días se les aplico de nuevo dos barridos con PinPointe Footlaser™ por uña, tal y como se indica anteriormente.

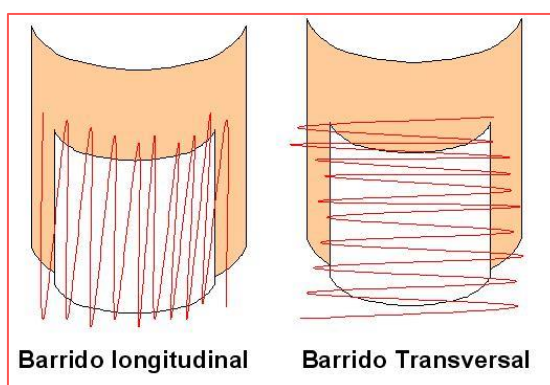


Figura 31. Barridos aplicados para el tratamiento con PinPointe Footlaser™

Y con el fin de controlar la infección en cierto grado, a todos los sujetos se les pautaron los siguientes consejos de higiene:

Ponerse después de cada sesión unos calcetines limpios/nuevos

Utilizar polvos pédicos antifúngicos en el calzado de forma rutinaria

No utilizar esmaltes

Secarse los pies bien después de lavarse, ayudándose si fuera necesario de un secador eléctrico.

Para comprobar la efectividad el tratamiento y valorar las recidivas del mismo, a los seis meses se realizó un cultivo a todos los sujetos para comprobar si seguía habiendo presencia de hongos en las uñas. Para esta confirmación se sometieron a cultivo tradicional las muestras obtenidas.

Por otro lado, valoramos la afectación de la lámina ungueal producida por la micosis antes y en la revisión de los seis meses. Para ello calculamos el OSI (índice de severidad de la onicomycosis) antes de comenzar el tratamiento y en la revisión de los 6 meses.

Al aplicar el tratamiento en la primera sesión los sujetos referían dolor. Por lo que decidimos evaluar el grado de dolor clínico mediante la escala de expresión facial VAS (ver figura 32), después de aplicar las dos últimas sesiones.



Figura 32. Escala de expresión facial VAS para la valoración del dolor clínico.

Al terminar el tratamiento se les realizó una encuesta de satisfacción del tratamiento.

Los estudios estadísticos se realizaron mediante el programa SPSS 15.0, fijándose la significación estadística en el 5% ($p < 0.05$).

Resultados.

De los 140 sujetos con sospecha de onicomicosis, los cultivos resultaron positivos en el 49,29% de los casos ($n=69$). Entre ellos, 12 sujetos decidieron no realizarse el tratamiento, 4 sujetos lo abandonaron porque referían mucho dolor y en tres casos no se pudo recoger la muestra para comprobar onicomicosis tras el tratamiento. Por tanto finalmente se les realizó el tratamiento y seguimiento completo a 50 sujetos, 40 mujeres y 10 hombres (ver tabla 16).

	Edad Media (años)	DS (rango de edad)
Población (n=50)	54.94	± 15.44 (19-84) años
Mujeres (n=40)	56.92	± 14.17(19-84) años
Hombres (n=10)	51	± 20.99 (19-74) años

Tabla 16. Descripción de la población tratada la onicomicosis con láser Nd:YAG 1064nm

El estudio morfológico de los cultivos de uñas aportó los siguientes datos: En el 68% ($n=34$) de los casos analizados la infección es producida por dermatofitos, en el 18% ($n=9$) por levaduras y en 14% ($n=7$) es una infección mixta.

Tras analizar los cultivos de las muestras de uñas recogidas a los 6 meses de haber finalizado el tratamiento, encontramos en el 70% de los casos ($n=35$) resultados positivos al crecimiento de hongo y en el 30% ($n=15$) los cultivos fueron negativos. La infección había remitido en el 23,5% de las infecciones por dermatofitos ($n=8$), 44,4% de las levaduras ($n=4$) y en el 42.9%

de las infecciones mixtas (n=3). Por lo que basándonos en estos datos podemos afirmar que el láser anteriormente descrito es sólo efectivo en un 30% de los casos, para la eliminación de la infección fúngica, según el protocolo aplicado.

A pesar de obtener estos resultados parciales, observamos que el aspecto macroscópico de la uña mejoraba notablemente en casi todos los casos. Por ello, procedimos a evaluar este otro aspecto.

Respecto a la valoración del daño ungueal, antes de comenzar el tratamiento obtuvimos una media de $22,80 \pm 9,67$ puntos el método OSI, y de $13,71 \pm 10,97$ puntos en la revisión a los 6 meses del tratamiento. Posteriormente se realizó el análisis estadístico, realizando la comparación de las medias obtenidas, mediante la prueba t de Student para muestras relacionadas. Se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p=0,000$). De esta forma podemos decir que la aplicación del láser consigue una mejora clínica de la uña.

Estudiando más detalladamente los resultados obtenidos, respecto a la mejora clínica encontramos que ninguna de las uñas tratadas empeoró. Además en el 14% (n=7) los signos clínicos desaparecieron (ver figura 33) y en el 48% de los casos (n=24) experimentan una mejora clínica (ver figura 34), según el método OSI. Sin embargo en el 52% (n=26) restante, a pesar de observar mejoría clínica, se mantiene en el mismo rango de gravedad (ver figura 35) (resultados más detallados en la tabla 17).



Figura 33. Imágenes de la misma de la uña antes (afectación grave según el método OSI) y después del tratamiento con el láser Nd:YAG 1064nm. En la que en la imagen de la derecha podemos apreciar la desaparición total se signos clínicos de onicomycosis y con un resultado negativo en el cultivo específico de hongo.



Figura 34. Imágenes de la misma de la uña antes (afectación grave según el método OSI) y después del tratamiento con el láser Nd:YAG 1064nm. En la que en la imagen de la derecha podemos apreciar la desaparición en gran medida los signos clínicos de onicomicosis (afectación leve según el método OSI) y con un resultado negativo en el cultivo específico de hongo.



Figura 35. Imágenes de la misma de la uña antes (afectación grave según el método OSI) y después del tratamiento con el láser Nd:YAG 1064nm. En la que en la imagen de la derecha podemos apreciar la desaparición parcial de los signos clínicos de onicomicosis pero manteniendo la misma gravedad según el método OSI y con un resultado positivo en el cultivo específico de hongo.

		OSI pre			Total	
			Leve	Moderado	Grave	Leve
OSI post	Curado	Recuento	1	0	6	7
		% de OSI pre	33,3%	0,0%	14,6%	14,0%
	Leve	Recuento	2	4	2	8
		% de OSI pre	66,7%	66,7%	4,9%	16,0%
	Moderado	Recuento	0	2	11	13
		% de OSI pre	0,0%	33,3%	26,8%	26,0%
	Grave	Recuento	0	0	22	22
		% de OSI pre	0,0%	0,0%	53,7%	44,0%
Total		Recuento	3	6	41	50
		% de OSI pre	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 17. Prueba de Chi-cuadrado que muestra la relación entre OSI post (post-tratamiento) y OSI pre (pre-tratamiento).

Por otro lado, debemos tener en cuenta que el tratamiento fue efectivo en el 100% de los casos (n=3) de afectación leve, en el 33,3% (n=2) de los casos moderados y en el 24.4% (n=10) de los graves (ver figura 34).

De los 15 casos en los que el tratamiento fue efectivo, es decir el cultivo fue negativo, en siete de ellos desaparecieron los signos (cura completa) (ver figura 33), mientras que cuatro de los casos seguían manifestado signos clínicos de magnitud leve según el OSI (ver figura 36), en tres casos moderado (ver figura 37) y en uno grave. No se encontró en ningún caso curación clínica sin curación microbiológica.



Figura 36. Imágenes de la misma de la uña antes (afectación grave según el método OSI) y después del tratamiento con el láser Nd:YAG 1064nm. En la que en la imagen de la derecha podemos apreciar la desaparición parcial se signos clínicos de onicomycosis pasando a una gravedad leve según el método OSI y con un resultado negativo en el cultivo específico de hongo.



Figura 37. Imágenes de la misma de la uña antes (afectación grave según el método OSI) y después del tratamiento con el láser Nd:YAG 1064nm. En la que en la imagen de la derecha podemos apreciar la desaparición parcial de los signos clínicos de onicomycosis pasando a una gravedad moderada según el método OSI y con un resultado negativo en el cultivo específico de hongo.

Respecto al dolor experimentado, los resultados obtenidos se recogen en la tabla 18. Podemos observar que en la segunda sesión todos los pacientes refieren dolor a la aplicación del láser y sin embargo en la tercera sesión 8 de los individuos tratados no refieren dolor alguno. Prevalce en mayor medida el dolor moderado en ambas sesiones.

Tipo de dolor	% 2ª sesión	% 3ª sesión
Sin dolor	0	8
Poco dolor	22	30
Dolor moderado	42	32
Dolor fuerte	26	14
Dolor muy fuerte	8	14
Dolor insoportable	2	2

Tabla 18. Tipos de dolor en porcentajes experimentados por los sujetos durante la aplicación de la terapia laser durante las dos últimas sesiones.

Respecto a la encuesta de satisfacción, solo se completaron 45, debido a su carácter anónimo y voluntario. Los resultados obtenidos fueron:

¿Ha utilizado los polvos pédicos para desinfectar su calzado?

93,3% **SI**

6,7 % **NO**

¿Cada cuánto tiempo ha aplicado los polvos pédicos?

- 6,7% Solo la primera vez
- 17,8% Diariamente
- 31,1% Una vez por semana
- 17,8% Varios días por semana
- 22,2% Cuando se acordaba
- 4,4% Nunca

¿Ha seguidos los consejos de higiene que se le indicaron?

- 93,3% **SI**
- 6,7 % **NO**

¿Cree que el tratamiento es eficaz?

- 80% **SI**
- 20 % **NO**

¿Ha utilizado lacas de esmalte en este tiempo?

- 22,2% **SI**
- 77,8% **NO**

¿Ha notado cambios en las uñas desde que se trata con el láser?

- 0% peor aspecto.
- 22,2% igual.
- 68,9% mejor aspecto.
- 8,9% no parece la misma uña (mejor aspecto).

¿Cuándo se le aplica el láser ha referido dolor?

- 11,1% **SI**
- 0 % **NO**
- 88,9% puntual (cuando se calienta)

Si refiere dolor ¿qué tipo de dolor?

- 4,4% eléctrico.
- 17,8% calor.
- 15,6% pinchazo.
- 62,2% quemazón.

¿Según la escala vas el dolor es?

- 0% sin dolor.
- 13,3% poco dolor.
- 26,7% dolor moderado.

46,7% dolor fuerte.
8,9% dolor muy fuerte.
4,4% dolor insoportable.

¿Qué sesión le ha dolido más?

15,6% primera.
17,8% segunda.
40% tercera.
26,7% todas iguales.

¿Si en dos años volviera a infectársele la uña se repetiría el tratamiento?

95,6% **SI**
4,4% **NO**

Discusión.

En este ensayo hemos tratado de evaluar la eficacia del tratamiento de la onicomicosis mediante la Aplicación del láser Nd:YAG 1064nm.

Para ello partimos de una muestra de 140 sujetos con signos clínicos que hacían sospechar una onicomicosis. De ellos, sólo 69 fueron positivos mediante cultivo para onicomicosis. Este dato coincide con lo encontrado en la literatura en la que se defiende que solo el 50% aproximadamente de las alteraciones ungueales son producidas por onicomicosis ⁹⁷.

Respecto a la eficacia obtenida en este trabajo sobre la aplicación de la terapia láser para la erradicación de la infección micótica en las uñas hemos obtenido un 30% de efectividad, es decir que en 15 de los 50 sujetos no encontramos presencia de hongos tras el tratamiento.

Además en un 14% de los casos tratados se consiguió una cura completa, es decir también desaparecieron los signos clínicos.

Podemos considerar que nuestros resultados se encuentran dentro de esa amplia horquilla ya existente en otros trabajos, en los que la efectividad obtenida oscila entre un 33 y 100%, y entre 0.08 y el 100% en lo que respecta a la cura completa ⁹⁵. Esta variabilidad en los resultados es debido a que los trabajos publicados sólo tiene en común el uso del láser Nd:YAG 1064nm pero su aplicación está asociada a otras diferentes variables concomitantes (pulso, spot, número de sesiones, intervalo entre sesiones, número de pases y energía aplicada, combinación con desbridamiento y/o tratamiento previo con antifúngicos). Por este motivo los resultados obtenidos sobre la eficacia del láser en los diferentes ensayos realizados no son comparables ^{89 95 98 99}. Además no hemos encontrado un trabajo que englobe las

mismas variables que nosotros hemos manejado, con el fin de poder comparar exactamente nuestros resultados.

Sin embargo los resultados que recogen los trabajos con láser muestran, en general, una mejoría de la patología a corto plazo, ya que los escasos estudios que realizaban seguimientos de larga duración tienen un alto número de reinfecciones ¹⁰⁰. Por este motivo nosotros decidimos recoger el cultivo post-tratamiento a los 6 meses de finalizar el estudio, de esta forma englobábamos en cierta medida las posibles recidivas, aunque tal y como apunta Francuzik W. *et al.* 2016 ⁹⁵ el seguimiento debería ser ampliado a un año, tiempo que tarda en renovarse totalmente la uña, y así poder descartar definitivamente las posibles recidivas.

Por otro lado, podemos afirmar que tras el tratamiento el 100% de los casos presento una mejoría clínica objetiva. Los resultados obtenidos con la valoración del método OSI y el análisis estadístico realizado nos permiten afirmar que la mejora observada es objetiva y significativa ($p=0.000$), añadiendo evidencia científica a los resultados obtenidos en trabajos anteriores ^{100 101 102}.

En cuanto al segundo aspecto que hemos estudiado, nuestros resultados nos permiten afirmar que esta técnica es dolorosa.

Aunque los fabricantes indican que este procedimiento es indoloro debido a los periodos de enfriamiento, en el presente estudio cuatro sujetos abandonaran el tratamiento por este motivo y todos los sujetos tratados en este trabajo experimentaron dolor. De igual forma lo refleja Francuzik W. *et al.* 2016 ⁹⁵.

Los sujetos tratados manifiestan que sienten un calentamiento o “quemazón” de la zona durante la aplicación del láser. Este dolor lo podemos considerar como un dolor moderado si la valoración se hace *in situ*, y un dolor fuerte cuando la valoración se hace a los seis meses del tratamiento. Estos resultados son acordes a los obtenidos por Noguchi H., *et al.* 2013 ¹⁰³ mediante la escala numérica análoga NRS (Numerical Rating Scale) con una puntuación media global de 5,1, correspondiente a la frontera entre un dolor entre moderado y fuerte.

Aunque esta medición del dolor es suficientemente objetiva, existen otros factores que pueden hacer variar la percepción del dolor, y que son difícilmente medibles. Por ejemplo la satisfacción que el sujeto obtiene con la mejoría en el aspecto de la uña es suficiente para que el sujeto exprese que volvería a repetir el proceso a pesar del dolor.

Por último, apuntar que Francuzik W., *et al* 2016 ⁹⁵ apunta una serie de pautas para la realización de futuros ensayos para este tratamiento (ver tabla 19), basándose en “CONSORT

2010 Explanation and Elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials” 104. Revisando todas estas premisas podemos comprobar que el presente trabajo cumple dichas premisas para la valoración de la eficacia del tratamiento láser en la onicomicosis.

Topic	Ítem*	
Sujetos	4 ^a	Los criterios de inclusión para los participantes, la edad, enfermedades del sujeto, el género, el diagnóstico según Hay et al. 105
	4b	Lugar de donde fueron recogidos las muestras
Intervención	5	Detallar las intervenciones realizadas en cada grupo: Tipo de láser que se utiliza y el nombre comercial. Longitud de onda, fluencia, duración del pulso, tamaño del spot, frecuencia del pulso, Protocolo de tratamiento, el número total de sesiones y su frecuencia. Medidas adicionales: ¿Se realiza desbridamiento? ¿Se pauta antimicótico tópico? El tiempo y el modo de administración.
Resultados	6a	Definir específicamente las mediciones previas y posteriores: Definición de la curación: micológica, clínica y completa. porcentaje pacientes que logran la curación micológica porcentaje de pacientes que logran la curación clínica, porcentaje de pacientes que lograron una curación completa, Llevar a cabo una planimetría del área lesionada previo y posterior al tratamiento.
Ciego	11a	Si se hace ciego, describir detalladamente el proceso.
Datos de referencia	15	Incluir una tabla con las características demográficas y clínicas de cada grupo: Describir la participación de uñas. Especificar qué patógenos se cultivaron. Incluir las enfermedades concomitantes.

Tabla 19. Pautas propuestas por Francuzik W, et al. para la realización de futuros ensayos para el tratamiento láser de onicomicosis, con el fin de evidenciar su eficacia .

*número de Ítem de acuerdo con la lista de CONSORT 2010.

Adaptado de “Francuzik, W., Fritz, K., & Salavastru, C. (2016). Laser therapies for onychomycosis - critical evaluation of methods and effectiveness. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV, 30(6), 936–42.”

Conclusiones.

El procedimiento utilizado para realizar el tratamiento con láser provoca una sensación dolorosa, aunque con una valoración de dolor moderado en la mayoría de los casos.

La aplicación del láser Nd:YAG 1064nm para el tratamiento de onicomicosis, según el protocolo utilizado, tiene un 30% de cura microbiológica y un 14% de cura completa,

A pesar de los resultados parciales en la eliminación de la infección, la aplicación del tratamiento implica una mejoría objetiva en el aspecto de la uña en el 100% de los casos.

Estudio de la eficacia del tratamiento láser en alteraciones ungueales idiopáticas.

Introducción.

En base a los resultados obtenidos con el estudio anterior sobre el tratamiento láser de 1064nm para la onicomicosis, observamos una importante mejoría en él, que además coincide con otros estudios realizados para la misma patología y con el mismo tipo de laser ^{89 95 100}. Apoyando de esta forma, el efecto bioestimulador que se logra con la aplicación del láser en general ⁹³.

Dado que en el estudio anterior sobre la eficacia del tratamiento láser en onicomicosis encontramos una mejoría en el aspecto clínico de la uña, a pesar de que no se conseguía eliminar el microorganismo causante en la totalidad de los casos. Decidimos estudiar si la aplicación de este método podía lograr mejorías en los pacientes de nuestra muestra, que no presentaban infección fúngica, y por tanto se trataba de otras patologías ungueales idiopáticas.

En la psoriasis ungueal existen publicaciones en las que se ha utilizado el tratamiento con láser pulsátil PDL de 595nm. En ellos se evaluó la patología y se obtuvo una mejoría clínica significativa de la lámina ungueal, tanto en el lecho ungueal como en la matriz, efectos que persiste en un periodo de tiempo prolongado. Estos resultados demuestran que este tipo terapia es eficaz en el tratamiento de las uñas con psoriasis ^{106 107}. En estos casos la luz actúa directamente sobre el proceso inflamatorio causante de la enfermedad mediante un efecto antiescleroso y antiinflamatorio, mediante la disminución de citoquinas proinflamatorias y aumentando las antiinflamatorias (TGF- β , IL-10) ¹⁰⁶.

Metodología.

Para llevar a cabo este ensayo clínico, analítico, observacional longitudinal prospectivo y no aleatorizado, se realizó el tratamiento a aquellos sujetos que presenta la lámina ungueal con sospecha de onicomycosis, pero que el resultado de los cultivos fue negativo (mediante el método tradicional), además no estaban bajo ningún tratamiento para dicha patología. De igual forma, los sujetos acudieron a consulta en las dependencias de alguna de las siguientes clínicas de práctica privada: Clínica Universitaria de la Unex, Clínica del Pie Eva Luengo Celador, Podoclínica Gallego Marcos y en la Clínica de Manuela Hernández. Respetando los principios de la declaración de Helsinki y además todos los sujetos dieron su consentimiento por escrito.

Se le realizó el tratamiento y seguimiento completo a 10 uñas pertenecientes a 8 sujetos diferentes, 6 mujeres y 2 hombres (ver tabla 20).

	Edad Media (años)	DS (rango de edad)
Población (n=10)	56.88	± 15.66 (30-80) años
Mujeres (n=8)	54.38	± 17.32 (30-80) años
Hombres (n=2)	51.00	± 7.07 (46-56) años

Tabla 20. Descripción de la población que fue tratada su onicopotía de origen idiopático con láser Nd:YAG de 1064nm en base a 10 sujetos.

A todos ellos se les aplicó el láser PinPointe Footlaser™ cedido por Cynosure® España. Las características técnicas del equipo y el protocolo de tratamiento son los mismos que los expuestos anteriormente en el tratamiento de la onicomycosis, y como ya hemos explicado está reconocida su inocuidad.

Para evaluar la progresión de las lesiones, debido a la heterogeneidad de las patologías tratadas y con el fin de unificar los resultados, se evaluó la proporción de la uña que estaba afectada. Para ello, se midió el porcentaje del eje longitudinal que está afectado antes y a los 6 meses después del tratamiento. Para la elección de este método de evaluación nos basamos en la teoría mixta del crecimiento de la uña¹⁰⁻¹⁵. Esta teoría describe que las alteraciones ungueales pueden ser de origen matricial o del lecho, asumiendo que si cesamos la causa que lo genera los signos clínicos serán eliminados con el crecimiento natural de la uña. Es decir, el signo se irá desplazando de proximal a distal hasta su desaparición.

Para hallar el eje longitudinal de la uña se siguió el siguiente procedimiento: en primer lugar se calculó el punto medio de la anchura de la uña a nivel del eponiquio y posteriormente se

calculó el punto medio de la anchura de la uña a nivel del hiponiquio. A continuación se unen los dos puntos y obtenemos el eje longitudinal de la uña (ver figura 38). Seguidamente se midió la extensión de la lesión en mm desde el hiponiquio y calculando el % del eje afectado siguiendo la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de eje afectado} = \text{mm Afectados} * 100 / \text{mm Totales del eje}$$

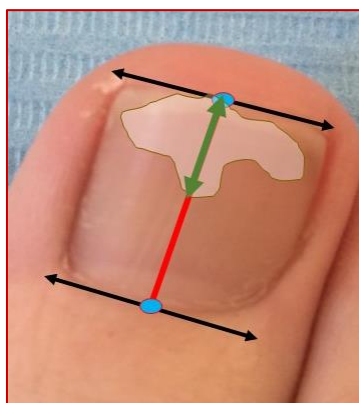


Figura 38. Simulación gráfica del cálculo del % de afectación del eje longitudinal de la uña. En el eje la flechas negras representan la anchura de la uña, los puntos azules son los puntos medios del ancho de la uña a nivel del hiponiquio y eponiquio, la línea roja es el eje longitudinal total de la uña, la mancha blanca simula la lesión ungueal y la flecha azul el % de afectación del eje longitudinal de la uña.

Los estudios estadísticos se realizaron mediante el programa SPSS 15.0, fijándose la significación estadística en el 5% ($p < 0.05$).

Resultados.

Tras obtener los datos necesarios para calcular el porcentaje del eje longitudinal de la uña afectado obtuvimos una media de 64.74 ± 14.92 % de la longitud del eje, antes de la aplicación laser. A los 6 meses después del tratamiento obtuvimos una media 45.51 ± 24.12 % de la longitud del eje afectado. Posteriormente se realizó el análisis estadístico, para comparar las medias obtenidas, mediante la prueba t de Student para muestras relacionadas. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,006$) entre las medidas realizadas antes de la aplicación y a los 6 meses de la misma. Encontramos una mejoría clínica en todas la uñas tratadas (ver figura 39). Por otra parte debemos observar que en ninguno de los casos los signos clínicos desaparecieron al 100% durante este periodo.



Figura 39. Las imágenes A y B corresponde al mismo sujeto, antes y después del tratamiento. Se observa una mejora clínica, pasando de un 67.85% a un 60.60 % de afectación del eje longitudinal. Mientras que las imágenes C y D corresponden a otro sujeto, antes y después del tratamiento, que también experimenta unos cambios clínicos significativos que pasa de tener un 41.93% a 28% de afectación del eje longitudinal.

Discusión.

Existía trabajos previos en los que se había aprobado la eficacia la efectividad del láser de 595-nm para el tratamiento de la psoriasis ungueal ¹⁰⁷. Además otros trabajos describen una mejoría clínica en uñas micóticas tratadas con el láser 1064nm ¹⁰⁰. Por ello quisimos probar la eficacia de esta longitud de onda de 1064 para el tratamiento de patologías ungueales idiopáticas.

Centrándonos en la patología ungueal idiopática, en el momento de redactar este trabajo solo hemos encontrado un estudio publicado de tres casos clínicos en los que se aplique un láser de 1064nm para el tratamiento de alteraciones ungueales idiopáticas ⁹⁴. En este trabajo el protocolo de aplicación del láser es diferente para cada uno de los casos, además la evaluación clínica de la patología está realizada de forma subjetiva. Sin embargo, nuestro trabajo utiliza el mismo protocolo de aplicación de la terapia láser y un método cuantitativo para la evaluación del daño. De esta forma, aplicando este método sistemático para medir la lesión ungueal podemos obtener resultados objetivos.

Los resultados de este estudio nos permiten afirmar que el tratamiento láser proporcione una mejoría clínica a corto plazo de las uñas con patología ungueal idiopática.

A pesar de que hemos obtenido una mejoría en todos los casos, este estudio requiere un seguimiento a largo plazo para testar permanencia de la mejora. Y hacer viable la inversión económica que supone el elevado coste de estos equipamientos y la limitación que ello supone para su uso en la clínica podológica a nivel privado.

Futuras líneas:

Confeccionar un estudio en el que incluyan un número relevante de sujetos, que además haga un seguimiento a largo plazo una vez finalizado el tratamiento, para poder valorar si la sintomatología clínica inicial vuelve a aparecer o remite definitivamente, y valorar si la aplicación del láser de 1064nm se comporta igual con alteraciones ungueales de alta prevalencia, como la psoriasis y el liquen plano.

Conclusiones.

La aplicación del láser Nd:YAG 1064nm para el tratamiento de alteraciones ungueales idiopáticas, según el protocolo utilizado, aporta una mejoría clínica en el total de los casos tratados.

VII. Discusión global

Actualmente las alteraciones ungueales son uno de los principales motivos de consulta en la clínica de podología. El presente trabajo trata de aportar avances en el manejo de dichas patologías para conseguir mejorar su diagnóstico y tratamiento ya que así lo demanda la comunidad científica actualmente ^{2 8 19}. Probablemente la alta incidencia de alteraciones ungueales sea debido a las comorbilidades asociadas a las mismas y el aumento del interés por el cuidado de la imagen que está experimentando la sociedad ^{2 3 37}. La principal patología que cursa con alteración de la lámina ungueal es la onicomycosis (50-68%), seguido de la psoriasis, liquen plano y traumatismos ^{20 74}.

Para un diagnóstico certero de las patologías ungueales no nos podemos basar sólo en el aspecto clínico con el que cursan porque todas ellas comparten sintomatología en común. Además, el diagnóstico se complica aún más porque existe una elevada incidencia de onicomycosis asociadas a otras patologías ungueales tales como los traumatismos y la psoriasis ⁴⁵, datos que hemos comprobado con nuestros resultados. Por todo ello las pruebas complementarias se hacen imprescindibles para un diagnóstico certero ^{4 20}.

Para el diagnóstico de la onicomycosis la técnica más extendida es el método tradicional (KOH y cultivo) ^{4 53}. Sin embargo, esta metodología presenta una serie de inconvenientes: el KOH tiene falsos negativos en un 5 a un 15% de los casos ^{51 59 60}, el cultivo requiere de 2 a 4 semanas para su confirmación y destreza para la identificación de la especie al microscopio ^{59 108}. Además el cultivo tiene hasta un 40% de los casos con falsos negativos ⁴⁹. En los últimos años, los métodos moleculares han frugado una base imprescindible para el diagnóstico biomédico, y una continua puesta en marcha de métodos diagnósticos clínicos en general, y en concreto en la detección de hongos mediante la técnica de PCR. Esta metodología se puso en marcha y hoy en día se realiza de forma rutinaria en nuestro grupo de investigación DEDAP ⁶⁵.

No encontramos diferencias significativas sobre la sensibilidad entre el cultivo y la PCR a la luz de los resultados obtenidos, a pesar de que existan pequeñas discordancias. De ésta forma, hemos comprobado que la técnica de PCR mejora notablemente el diagnóstico de la onicomycosis, especialmente en cuanto a la reducción del tiempo de obtención del resultado a unas horas para la confirmación del diagnóstico frente a las 3-4 semanas del método tradicional y en la especificidad de la detección del agente infectante ya que si existe microorganismo este es detectado aunque no esté vivo. Así mismo hemos detectado una mayor incidencia de nuevos agentes infectantes. Esto puede ser debido a la presencia de una población envejecida y mayores porcentajes de inmunodepresión o estilos de vida que hacen que sean más frecuentes otros hongos no dermatofitos ^{4 21 32}.

Después de comprobar la presencia o no de infección micótica, en aquellos casos en los que el resultado sea negativo debemos comprobar si la patología es producida por la psoriasis. Esta dermatopatía es la segunda causa que produce alteración en el aparato ungueal ⁴⁵.

Para el diagnóstico de la psoriasis ungueal, en estos momentos, sólo se cuenta con la confirmación mediante biopsia del tejido afectado, lo cual se realiza en pocas ocasiones por lo invasivo de la prueba. En la mayoría de los casos se basa en la clínica que muestra el paciente en las lesiones. Es importante comentar que la biopsia requiere una alta pericia por parte del facultativo y la ejecución de la misma es muy invasiva, pudiendo producir una mayor alteración del aparato ungueal ³. En el presente trabajo se muestra un procedimiento de diagnóstico de la psoriasis, mediante la detección de β -Defensina 2 en plasma, de forma poco invasiva (un análisis de sangre), rápida y sencilla con la que podemos diagnosticar prematuramente la psoriasis a través de la psoriasis ungueal incipiente, por ser el primer signo de la enfermedad en el 10% de los casos ^{8 40 43}.

No nos podemos olvidar de los elevados índices de prevalencia con la que la alteración ungueal esta asociada a onicomycosis y a psoriasis. Está descrito en la bibliografía que el 47% de los sujetos que sufren psoriasis ungueal tienen asociada una onicomycosis ⁴⁵. En el presente estudio, en nuestra población, este porcentaje se eleva al 72%. De igual modo sucede en muchos casos en los que no encontramos lesiones típicas de la psoriasis en otras partes del cuerpo, en los que la alteración ungueal es el único signo de la enfermedad ^{8 35 82}.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, proponemos un algoritmo basado en pruebas de laboratorio para el diagnóstico de alteraciones ungueales, que podemos ver en la figura 40.

Una vez identificada la causa que produce la alteración ungueal necesitamos tratarla para poder resolver la patología y de esta forma concluir el abordaje clínico y terapéutico. Para que un tratamiento sea eficaz hay que tener en cuenta una serie de cuestiones previas y estrategias como la higiene, la autonomía y la constancia del paciente, ya que la mayoría de los tratamientos son de larga duración, lo que supone una alta frecuencia de abandono de los mismos. Esto hace que los sujetos que las sufren demanden tratamientos rápidos, eficaces y sencillos ^{2 3 23}.

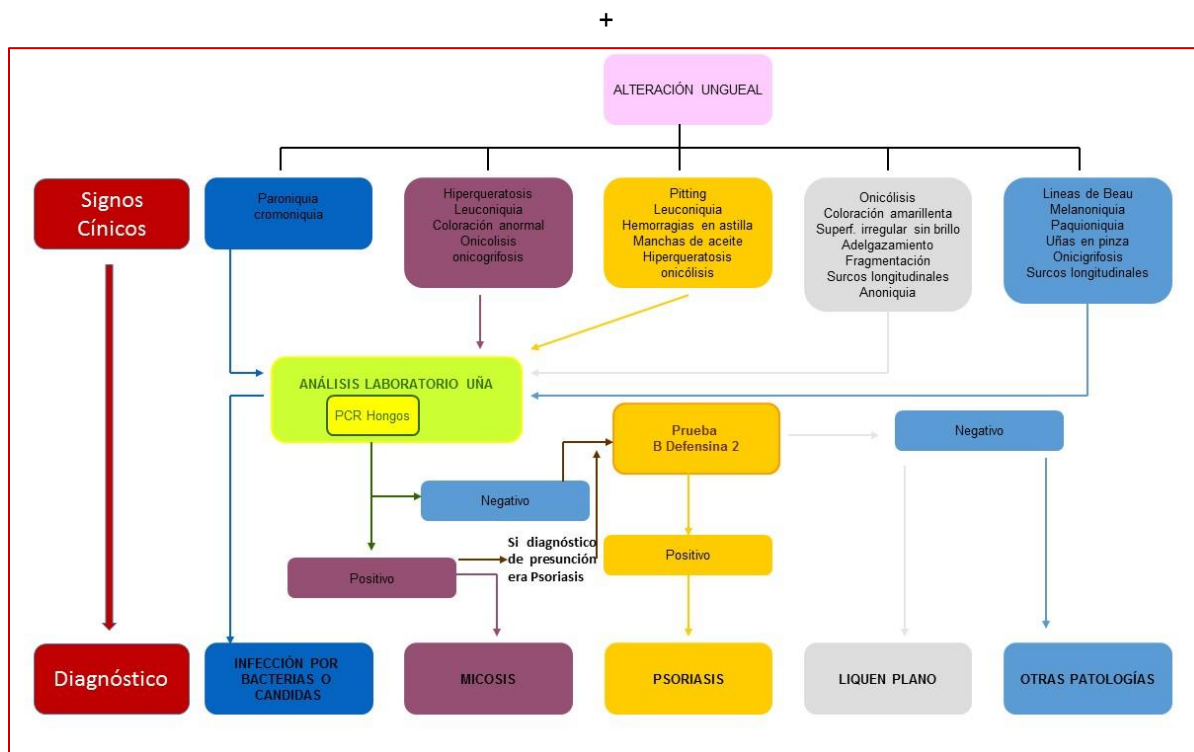


Figura 40. Algoritmo basado en pruebas de laboratorio para el diagnóstico de las alteraciones ungueales.

En la segunda parte del trabajo nos centramos en estudios sobre eficacia del tratamiento de estas patologías con la aplicación del láser Nd:YAG 1064nm. Se propone el tratamiento con láser con el fin de satisfacer la demanda de los pacientes y por la existencia de trabajos con resultados prometedores, pero en algunos casos con falta de evidencia científica, sobre su eficacia en la resolución de estas alteraciones^{89 90 94}.

En primer lugar nos centramos en el tratamiento de la onicomycosis. El tratamiento farmacológico depende del agente causal, usándose diferentes principios activos, y oscilando su duración entre 3 y 15 meses de tratamiento. Las tasas de curación que se obtienen son muy variables dependiendo del trabajo, y varían entre un 38 y un 94%³¹. Existiendo también una amplia horquilla en el tratamiento con láser, que oscila entre un 33 y 100% respecto a la efectividad y entre 0.08 y el 100% en lo que respecta a la cura completa, según los trabajos publicados de los que no se puede concluir un resultado definitivo desde el punto de vista científico⁹⁵.

En el presente trabajo, mediante la aplicación láser en onicomycosis, hemos obtenido un 30% de efectividad y tan solo un 14% de cura completa (microbiológica y clínica). Podemos considerar que nuestros resultados son fiables, ya que nuestro ensayo sigue los criterios descritos por Francuzik, W. *et al* en 2016⁹⁵ que defiende la evidencia científica en el ensayo clínico.

Lo que tiene una evidencia incuestionable es la mejora clínica que experimenta la uña a corto plazo, valorada mediante los cálculos del método OSI, que demuestra el efecto bioestimulante del láser sobre los tejidos tratados ⁹³. Las evidencias comprobadas de una mejoría estética, sin embargo no se traducen, a largo plazo como curación del aparato ungueal, por lo que se necesitarían más estudios y distintas aplicaciones y ensayos para poder asumir un efecto curativo de dicho tratamiento.

Esta regeneración de la uña hizo que posteriormente nos centráramos en el tratamiento con láser de patologías idiopáticas ungueales, que según el protocolo utilizado, experimentan cambios clínicos significativamente favorables. Los datos del presente trabajo se obtienen mediante una valoración cuantitativa con la que unificar la valoración (método de valoración del % del eje afectado), con la que no cuentan los trabajos publicados hasta la fecha ⁹⁴. Es por tanto una metodología innovadora para la evaluación de las patologías ungueales y así mismo los resultados del tratamiento de la patología idiopática obtenidos son muy alentadores para el futuro tratamiento de dichas patologías mediante aplicación del láser.

Finalmente y con los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir que los mismos han aportado mejoras innovadoras en las técnicas diagnósticas y terapias terapéuticas con las que abordar la patología ungueal, consiguiendo un diagnóstico rápido y más preciso, así como tratamientos eficaces, más en concreto en patologías idiopáticas y en tratamiento de onicomycosis a corto plazo. Consiguiendo así satisfacer la demanda de la sociedad y contribuyendo a mejorar la asistencia en el ejercicio de la podología.

Declaración de conflictos de intereses.

Los autores declaran que no existen conflicto de intereses en ninguno de los estudios realizados.

VIII. Conclusiones globales

- We can conclude that the application of the PCR technique improves the diagnosis of onychomycosis, especially with regard to the reduction of time for diagnosis confirmation as well as the detailed detection of the infecting agent.
- The detection of β -Defensin 2 in plasma is a noninvasive, quick and simple technique by which ungueal psoriasis could be diagnosed.
- The results seem to indicate that high levels of β -Defensin 2 do not protect from the fungal infection of the nail.
- The application of Nd:YAG 1064nm laser in the onychomycosis treatment (according to the used protocol) produce the microbiological cure in 30 per cent of the patients and the complete cure in 14 per cent.
- In spite of the partial results in the elimination of the fungal infection, the application of the laser treatment implies an objective improvement of the nail appearance in the 100 per cent of the cases.
- The application of Nd:YAG 1064nm laser in the treatment of idiopathic nail alterations (according to the used protocol) contributes to clinical improvement to all the cases dealt with.

IX. Bibliografía consultada

1. Camacho FM, Marscaró JM BR. Onicología. Biología y Alteraciones de La Unidad Ungueal. Grupo aula. Madrid; 2006.
2. Larruskain Garmendia J, Idígoras Viedma P, Mendiola Arza J. Onicomycosis: diagnóstico y tratamiento. Inf Ter del Sist Nac Salud. 2008; 32(3):83-92.
3. Sánchez-Regaña M, Umbert P. Aspectos diagnósticos y terapéuticos de la psoriasis ungueal. Actas Dermosifiliogr. 2008; 99(1):34-43.
4. Tchernev G, Penev PK, Nenoff P, et al. Onychomycosis: modern diagnostic and treatment approaches. Wiener Medizinische Wochenschrift. 2013; 163(1-2):1-12.
5. De Berker DAR, André J, Baran R. Nail biology and nail science. Int J Cosmet Sci. 2007; 29(4):241-275.
6. Sánchez-Regaña M, Katsambas A, Ocampo J. Distrofias Ungueales. ISDIN ; 2009.
7. Abad S-C, FJ VD. Embriología, anatomía, fisiología, historia clínica y pruebas complementarias en onicología. In: Atlas de Las Enfermedades de Las Uñas. Barcelona: ESMONpharma; 2008:1-12.
8. Jiaravuthisan MM, Sasseville D, Vender RB, Murphy F, Muhn CY. Psoriasis of the nail: anatomy, pathology, clinical presentation, and a review of the literature on therapy. J Am Acad Dermatol. 2007;57(1):1-27.
9. Sánchez Carpintero Abad I, Vázquez Dova FJ . Embriología anatomía, fisiología, historia clínica y pruebas complementarias en onicología. In: Atlas de Enfermedades de Las uñas. Barcelona: ESMONpharma; 2008: 1-13.
10. García Carmona FJ, Pascual Huerta J, Fernández Morato D, Trincado Villa L, Arcas Lorente C. Anatomía quirúrgica ungueal [primera parte]. Rev española Podol. 2015; 26(2):64-74.
11. Sánchez Conejo-Mir J, Camacho FM. Biología de la uña. Embriología. Anatomía. Fisiología. In: Onicología. Biología y Alteraciones de La Unidad Ungueal. Madrid: Grupo Aula Medica; 2006:1-18.
12. Mayordomo R. Desarrollo embrionario de la uña y formación del aparato ungueal. In: Podología : atlas de Cirugía Ungueal. Madrid: panamericana; 2006:3-5.

13. Martínez-Nova A. Podología. Anatomía e histología del aparato ungueal. In: Atlas de Cirugía Ungueal. Barcelona: Panamericana ; 2014.
14. Sick H, Wolfram-Gabel R. Vascular networks of the periphery of the finger nail. Arch Anat Histol Embryol. 1993;75: 47-60.
15. Hidalgo Ruiz S. Clasificación de las patologías ungueales: Estadística de la clínica podológica de la UB. Rev española Podol. 1999;10(7):349-408.
16. Sammans P. The Nail in Diseases. Heinnenman. London; 1978.
17. McCarthy DJ. Anatomic considerations of the human nail. Clin Podiatr Med Surg. 2004;21(4):477-91, v.
18. Silva P P, Vera K C, Kolbach R M, Fernández L F. Sospecha de patologías sistémicas a través de alteraciones ungueales. Rev Med Chil. 2006;134(2)231-238.
19. Barrera-Vigo MV, Tejera-Vaquerizo A, Mendiola-Fernández M, Cid J, Cabra-de Luna B, Herrera-Ceballos E. La biopsia ungueal: un método diagnóstico de gran utilidad. Estudio de 15 casos. Actas Dermosifiliogr. 2008;99(8):621-627.
20. Rich P, Elewski B, Scher RK, Pariser D. Diagnosis, clinical implications, and complications of onychomycosis. Semin Cutan Med Surg. 2013;32(2 Suppl 1):S5-8.
21. Effendy I, Lecha M, Feuilhade de Chauvin M, Di Chiacchio N, Baran R. Epidemiology and clinical classification of onychomycosis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2005; 19 Suppl 1:8-12.
22. Schneider SL, Tosti A. Tips to diagnose uncommon nail disorders. Dermatol Clin. 2015; 33(2):197-205.
23. Ballesté R., Mousqués N. GE. Onicomycosis. Revisión del tema. Rev Med Uruguay. 2003: 93-106.
24. Weinberg JM, Koestenblatt EK, Tutrone WD, Tishler HR, Najarian L. Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. J Am Acad Dermatol. 2003; 49(2):193-197.
25. Vázquez Doval F-J. Glosario terminológico de las alteraciones ungueales. In: Atlas de Las Enfermedades de Las Uñas. Barcelona: ESMONpharma; 2008:13-26.

26. Baran R, Camacho FM, Mascaró JM. Glosario. Exploración en onicología. In: Onicología. Biología y Alteraciones de La Unidad Ungueal. Madrid: Grupo Aula Medica; 2006:19-36.
27. Camacho FM, Tosti A, Mazuecos J, Iorizzo M. Infecciones de las uñas: bacterias, virales y fúngicas. Infestaciones. In: Onicología. Biología y Alteraciones de La Unidad Ungueal. Madrid: Grupo Aula Medica; 2006:49-94.
28. Carney C, Tosti A, Daniel R, et al. A new classification system for grading the severity of onychomycosis: Onychomycosis Severity Index. Arch Dermatol. 2011;147(11):1277-1282.
29. Griffiths CEM, Barker JNWN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. Lancet. 2007;370(9583):263-271.
30. Scher RK, Rich P, Pariser D, Elewski B. The epidemiology, etiology, and pathophysiology of onychomycosis. Semin Cutan Med Surg. 2013;32(2 Suppl 1):S2-4.
31. Leelavathi M, Noorlaily M. Onychomycosis nailed. J Acad Fam Physicians Malaysia. 2014; 9(1):2-7.
32. Pereiro M, Gómez-Bernal S, Rodríguez-Pazos L, Toribio J. Micosis más frecuentes en inmunodeprimidos. Piel. 2010; 25(2):91-99.
33. Rigopoulos D, Papanagiotou V, Daniel R, Piraccini BM. Onychomycosis in patients with nail psoriasis: a point to point discussion. Mycoses. 2017 Jan;60(1):6-10.
34. Vázquez Doval F-J. Onicopatías por agentes vivos. In: Atlas de Las Enfermedades de Las Uñas. Vol Barcelona: ESMONpharma; 2008:75-82.
35. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. Nature. 2007;445(7130):866-873.
36. Batista Romagosa M, Perez Bruzón M. Elementos más importantes en la patogenia de la psoriasis. Medisan. 2009; 13(3).
37. M Ríos J., Ríos M. Inmunogenética de la Psoriasis y de la Artritis Psoriásica. Rev méd cien. 2010; 23(1):32-39.
38. Kurd SK, Gelfand JM. The prevalence of previously diagnosed and undiagnosed psoriasis in US adults: results from NHANES 2003-2004. J Am Acad Dermatol. 2009; 60(2):218-224.

39. Chouela EN. Epidemiología y genética de la psoriasis. *Dermatología Argentina*. 2011;17(3):236-239.
40. Padín Galea JM, López Herranz M, Martín Martínez S, García Carmona FJ. Psoriasis y su afectación en el pie. *Podol Clínica*. 2005; Monográfico:6-16.
41. Valdivia-Blondet L. patogenia de la psoriasis. *Arch Dermatol Perú*. 2008; 18: 340-345.
42. Al-Mutairi N, Noor T, Al-Haddad A. Single Blinded Left-to-Right Comparison Study of Excimer Laser Versus Pulsed Dye Laser for the Treatment of Nail Psoriasis. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2014;4(2):197-205.
43. Schons KRR, Knob CF, Murussi N, Beber AAC, Neumaier W, Monticelo OA. Nail psoriasis: a review of the literature. *An Bras Dermatol*.2013: 89(2):312-317.
44. Leibovici V, Hershko K, Ingber A, Westerman M, Leviatan-Strauss N, Hochberg M. Increased prevalence of onychomycosis among psoriatic patients in Israel. *Acta Derm Venereol*. 2008;88(1):31-33.
45. Orellna Arauco AR, Padilla Desgarenes MC, Pedrero Peralta ML. Frecuencia de onicomicosis en pacientes con psoriasis y alteraciones ungueales. *Dermatol Rev Mex*. 2012;56(2):109-114.
46. Duhard-Brohan E. Psoriasis of the nail. *Ann Dermatol Venereol*. 1999:126.
47. Baran R, de Berker D. La uña en la infancia y en la senectud. In: *Onicología. Biología Y Alteraciones de La Unidad Ungueal*. Vol Madrid: Grupo Aula Medica; 2006:37-48.
48. Rigopoulos D, Katsambas A. Exploración de las uñas. In: *Distrofias Ungueales*. Vol Isdin; 2009:13-14.
49. Petinataud D, Berger S, Contet-Audonnoeu N, Machouart M. Molecular diagnosis of onychomycosis. *J Mycol Med*. 2014;24(4):287-295. doi:10.1016/j.mycmed.2014.10.008.
50. Álvarez-Pérez S, Eulalia García M, Luis Blanco J. Diagnóstico micológico: algo está cambiando. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26(10):638-646. doi:10.1016/S0213-005X(08)75280-7.

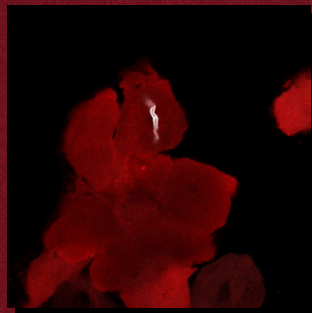
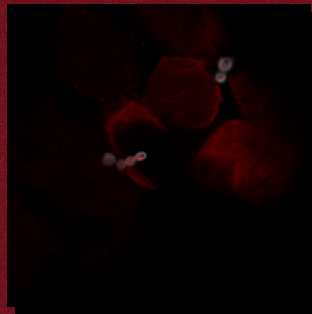
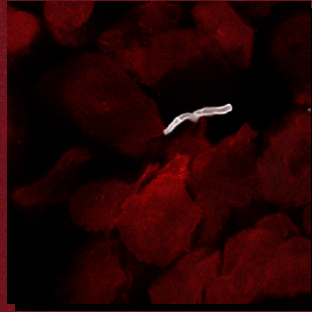
51. Brillowska-Dabrowska A, Saunte DM, Arendrup MC. Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *J Clin Microbiol*. 2007;45(4):1200-1204. doi:10.1128/JCM.02072-06.
52. Manhart R, Rich P. Nail psoriasis. *Clin Exp Rheumatol*. 2015 Sep-Oct;33(5 Suppl 93):S7-13.
53. Magnani JW, Dec GW. Onychomycosis: Current Trends in Diagnosis and Treatment. *American Family Physician*. 2013:876-890.
54. Rich P, Scher RK. Nail psoriasis severity index: a useful tool for evaluation of nail psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 2003;49(2):206-212.
55. Parrish CA, Sobera JO, Elewski BE. Modification of the Nail Psoriasis Severity Index. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53(4):745-6-7.
56. Cantoresi F, Caserini M, Bidoli A, et al. Randomized controlled trial of a water-soluble nail lacquer based on hydroxypropyl-chitosan (HPCH), in the management of nail psoriasis. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2014;7:185-190.
57. Tucker JRJ. Nail Deformities and Injuries. *Prim Care*. 2015;42(4):677-691.
58. Moreno-Giménez JC, Jiménez-Puya R, Galán-Gutiérrez M. Comorbilidades en psoriasis. *Actas Dermosifiliogr*. 2010;101:55-61.
59. Petrini B, von Rosen M-L. Optimal dermatophyte diagnosis requires both microscopy and culture. *Lakartidningen*. 2002;99(41):4084.
60. Balajee SA, Sigler L, Brandt ME. DNA and the classical way: identification of medically important molds in the 21st century. *Med Mycol*. 2007; 45(6):475-490.
61. Martínez García S, Martínez Pilar L, Crespo Erchiga V. Tratamiento de las onicomycosis. *FMC - Form Médica Contin en Atención Primaria*. 2007;14(4):217-221.
62. Shehata AS, Mukherjee PK, Aboulatta HN, Akhras AI, Abbadi SH, Ghannoum MA. Single-step PCR using (GACA) 4 primer: utility for rapid identification of dermatophyte species and strains. *J Clin Microbiol*. 2008;46(8):2641-2645.

63. Rodríguez-Tudela JL, Cuesta I, Gómez-López A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martínez L, Cuenca-Estrella M. [Molecular techniques in mycology]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26 Suppl 1:47-53.
64. Li HC, Bouchara J-P, Hsu MM-L, Barton R, Su S, Chang TC. Identification of dermatophytes by sequence analysis of the rRNA gene internal transcribed spacer regions. *J Med Microbiol*. 2008;57(Pt 5):592-600.
65. Iglesias Sánchez MJ, Pérez Pico AM, Marcos Tejedor F, Iglesias Sánchez MJ, Mayordomo Acevedo R. Using a Polymerase Chain Reaction as a Complementary Test to Improve the Detection of Dermatophyte Fungus in Nails. *J Am Pod Med Assoc*. 2014;104(3):233-237.
66. Wang J-L, Chang S-C, Hsueh P-R, Chen Y-C. Species distribution and fluconazole susceptibility of *Candida* clinical isolates in a medical center in 2002. *J Microbiol Immunol Infect*. 2004;37(4):236-241.
67. Karp G. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. McGraw-Hill Interamericana; 2014.
68. Castaño L, Bilbao JR. Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (1): Conceptos básicos. *An Esp Pediatr*. 1996;45:315-320.
69. Ansorge W, Patrinos GP. *Molecular Diagnostics: Past, Present, and Future*. In: *Molecular Diagnostics*. Elsevier Academic Press; 2005:18-24.
70. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487-491.
71. Bartlett JMS, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*. 2003;226:3-6.
72. Green MR, Sambrook J. *Polymerase Chain Reaction*. In: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Vol 4a. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012:455-540.
73. Peters H, Robinson P. *Temperature and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*. In: *Molecular Diagnostics*. Vol Elsevier Academic Press; 2005:83-96.
74. Gupta AK, Cernea M, Foley KA. Improving Cure Rates in Onychomycosis. *J Cutan Med Surg*. June 2016.

75. Mirzahoseini H, Omidinia E. Application of PCR-RFLP to rapid identification of the main pathogenic dermatophytes from clinical specimens. *Iran J.* 2009.
76. Hay RJ, Jones RM. New molecular tools in the diagnosis of superficial fungal infections. *Clin Dermatol.* 2010;28(2):190-196.
77. Gupta AK, Zaman M, Singh J. Fast and sensitive detection of *Trichophyton rubrum* DNA from the nail samples of patients with onychomycosis by a double-round polymerase chain reaction-based assay. *Br J Dermatol.* 2007;157(4):698-703.
78. Fletcher CL, Hay RJ, Smeeton NC. Observer agreement in recording the clinical signs of nail disease and the accuracy of a clinical diagnosis of fungal and non-fungal nail disease. *Br J Dermatol.* 2003;148(3):558-562.
79. Garcia-Doval I, Cabo F, Monteagudo B, et al. Clinical diagnosis of toenail onychomycosis is possible in some patients: cross-sectional diagnostic study and development of a diagnostic rule. *Br J Dermatol.* 2010;163(4):743-751.
80. Fonseca D, Contreras Bravo N, Mateus Arbeláez H. *Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular Su Aplicación En Genética Básica.* Editorial Universidad del Rosario; 2010.
81. Grover C, Reddy BSN, Uma Chaturvedi K. Diagnosis of nail psoriasis: importance of biopsy and histopathology. *Br J Dermatol.* 2005;153(6):1153-1158.
82. Ariel Hasson N., Néstor Carreño O., Pablo Uribe G. JMD. Actualización en desórdenes pigmentarios, patología ungueal y del pelo. *Rev Chil Dermatol.* 2011;27(1):8-15.
83. Elder JT, Bruce AT, Gudjonsson JE, et al. Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology. *J Invest Dermatol.* 2010; 130(5):1213-1226.
84. Kolbinger F, Loesche C, Valentin M-A, et al. β -Defensin 2 is a responsive biomarker of IL-17A-driven skin pathology in patients with psoriasis. *J Allergy Clin Immunol.* August 2016.
85. Hollox EJ, Huffmeier U, Zeeuwen PLJM, et al. Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number. *Nat Genet.* 2008;40(1):23-25.

86. Jansen PAM, Rodijk-Olthuis D, Hollox EJ, et al. Beta-defensin-2 protein is a serum biomarker for disease activity in psoriasis and reaches biologically relevant concentrations in lesional skin. *PLoS One*. 2009;4(3):e4725.
87. Puig L, Julià A, Marsal S. The pathogenesis and genetics of psoriasis. *Actas Dermosifiliogr*. 105(6):535-545.
88. Turina MC, Landewé R, Baeten D. Lessons to be learned from serum biomarkers in psoriasis and IBD – the potential role in SpA. *Expert Rev Clin Immunol*. October 2016:1-12.
89. Bristow IR. The effectiveness of lasers in the treatment of onychomycosis: a systematic review. *J Foot Ankle Res*. 2014;7:34.
90. Treewittayapoom C, Singvahanont P, Chanprapaph K, Haneke E. The effect of different pulse durations in the treatment of nail psoriasis with 595-nm pulsed dye laser: a randomized, double-blind, inpatient left-to-right study. *J Am Acad Dermatol*. 2012;66(5):807-812.
91. Anderson RR, Parrish JA. Selective photothermolysis: precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation. *Science*. 1983;220(4596):524-527.
92. González-Rodríguez AJ, Lorente-Gual R. Current indications and new applications of intense pulsed light. *Actas dermo-sifiliográficas*. 2015;106(5):350-364.
93. Vázquez Amela FX, Matas Muntaner R. Uso del láser en podología. *Rev española Podol*. 1999;10(1):3-7.
94. Ibrahim O, Doumit J, Zhang A. Successful Treatment of Idiopathic Onychodystrophy With 300 Microsecond 1064 nm Nd:YAG Laser. *J Drugs Dermatol*. 2015;14(7):750-752.
95. Francuzik W, Fritz K, Salavastru C. Laser therapies for onychomycosis - critical evaluation of methods and effectiveness. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016;30(6):936-942.
96. Badgwell Doherty C, Doherty SD, Rosen T. Thermoherapy in dermatologic infections. *J Am Acad Dermatol*. 2010;62(6):909-27; quiz 928.
97. Vlahovic TC. Onychomycosis. *Clin Podiatr Med Surg*. 2016;33(3):305-318.
98. Gupta AK, Paquet M. A retrospective chart review of the clinical efficacy of Nd:YAG 1064-nm laser for toenail onychomycosis. *J Dermatolog Treat*. 2015;26(4):376-378.

99. Kim MS, Jung JY, Cho EB, Park EJ, Kim KH, Kim KJ. The effectiveness of 1,064-nm long-pulsed Nd:YAG laser in the treatment of severe onychomycosis. *J Cosmet Laser Ther.* April 2016:1-6.
100. Ortiz AE, Avram MM, Wanner MA. A review of lasers and light for the treatment of onychomycosis. *Lasers Surg Med.* 2014;46(2):117-124.
101. Wanitphakdeedecha R, Thanomkitti K, Bunyaratavej S, Manuskiatti W. Efficacy and safety of 1064-nm Nd:YAG laser in treatment of onychomycosis. *J Dermatolog Treat.* 2016;27(1):75-79.
102. Hees H, Jäger MW, Raulin C. Treatment of onychomycosis using the 1 064 nm Nd:YAG laser: a clinical pilot study. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2014;12(4):322-329.
103. Noguchi H, Miyata K, Sugita T, Hiruma M, Hiruma M. Treatment of onychomycosis using a 1064nm Nd:YAG laser. *Med Mycol J.* 2013;54(4):333-339.
104. Moher D, Hopewell S, Schulz KF, et al. CONSORT 2010 explanation and elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ.* 2010;340:c869.
105. Hay RJ, Baran R. Onychomycosis: A proposed revision of the clinical classification. *J Am Acad Dermatol.* 2011;65(6):1219-1227.
106. González-Rodríguez a. J, Lorente-Gual R. Indicaciones actuales y nuevas aplicaciones de los sistemas de luz pulsada intensa. *Actas Dermosifiliogr.* 2015;106(5):350-364.
107. Maranda EL, Nguyen AH, Lim VM, Hafeez F, Jimenez JJ. Laser and light therapies for the treatment of nail psoriasis. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* May 2016.
108. Gadea I, Cuenca-Estrella M, Martín E, Pemán J, Pontón J, Luis Rodríguez-Tudela J. Procedimientos de diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007;25(5):336-340.



UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

