



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE GRADUACION OPORTUNA

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO
SOCIAL**

**CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA
UMAE HOSPITAL GENERAL
"DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA"**

**OTORRINOLARINGOLOGIA Y CIRUGIA DE
CABEZA Y CUELLO**

*EXPRESIÓN PROTEICA DE LAS SUBUNIDADES DE LOS
RECEPTORES DE ACETILCOLINA nAChRs alpha 3 y 7 EN PACIENTES
CON POLIPOSIS NASAL Y SU ASOCIACIÓN CON LA EXPOSICIÓN A
HUMO DE TABACO"*

MODALIDAD DE GRADUACION QUE PARA OPTAR POR EL
GRADO DE ESPECIALISTA EN:

**OTORRINOLARINGOLOGIA Y CIRUGIA DE
CABEZA Y CUELLO**

PRESENTA:

Dra. Denys Alejandra Lara Sanchez

TUTOR:

Dra. Bertha Beatriz Montaña Velázquez.



MÉXICO, D.F., 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ALUMNO:

Dra. Denys Alejandra Lara Sánchez

alejandradenys@hotmail.com

Médico residente de cuarto año adscrito al CMNNR Dr. Gaudencio Garza La Raza, IMSS, México, Distrito Federal, Calzada Vallejo, Jacarandas S/N 20990, Tel. 57245900, 23446.

INVESTIGADOR RESPONSABLE

Dra. Beatriz Montaña Velázquez

beamont_2000@yahoo.com.mx

Médico Adscrito al Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello, HG CMN La Raza, IMSS, México, Distrito Federal, Calzada Vallejo, Jacarandas S/N 20990 , 57245900, ext 23446.

COLABORADORES:

DRA. Kathrine Jauregui Renaud (participación intelectual)

kathrine.jauregui@imss.gob.mx

Investigador adscrito a la Unidad de Investigación Médica en Otoneurología, CMN Siglo XXI. 56276900, ext 21269

DR. SILVIO JURADO HERNÁNDEZ

silviojurado@yahoo.com.mx

Médico Adscrito al Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello, HG CMN La Raza, IMSS, México, Distrito Federal, Calzada Vallejo, Jacarandas S/N 20990 , Tel. 57245900, 23446

DR. FRANCISCO GARCIA VAZQUEZ

momoxco@yahoo.com

Doctor en Ciencias adscrito al laboratorio de patología molecular, departamento de anatomía patológica, INP 10845515, 10840900 ext 1119.

DRA. MARIA DEL CARMEN DE LA MORA ROMERO

Jefe de Servicio Patología Centro Médico Nacional La Raza, IMSS, México, Distrito Federal, Calzada Vallejo, Jacarandas S/N 20990 , Tel. 57245900, 23446

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA
UMAE HOSPITAL GENERAL
DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA
AUTORIZADA POR:**



**DRA. LUZ ARCELIA CAMPOS NAVARRO
DIRECTORA DE EDUCACION E INVESTIGACION EN SALUD**

**DRA. LUZ ARCELIA CAMPOS NAVARRO
PROFESORA TITULAR DEL CURSO DE OTORRINOLARINGOLOGIA Y CIRUGIA DE
CABEZA Y CUELLO**

**DR. SILVIO JURADO HERNANDEZ
JEFE DE SERIVIO DE OTORRINOLARINGOLOGIA Y CIRUGIA DE CABEZA Y CUELLO**

**DRA. BERTHA BEATRIZ MONTAÑO VELAZQUEZ
OTORRINOLARINGOLOGIA Y CIRUGIA DE CABEZA Y CUELLO
ASESORA**

**DRA. DENYS ALEJANDRA LARA SANCHEZ
RESIDENTE DE CUARTO AÑO DE OTORRINOLARINGOLOGIA Y CIRUGIA DE
CABEZA Y CUELLO**



Dirección de Prestaciones Médicas
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud



"2014, Año de Octavio Paz".

Dictamen de Autorizado

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud 3502
HOSPITAL GENERAL DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA, CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA, D.F. NORTE

FECHA 13/05/2014

DRA. BERTHA BEATRIZ MONTAÑO VELAZQUEZ

P R E S E N T E

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

EXPRESIÓN PROTEICA DE LAS SUBUNIDADES DE LOS RECEPTORES DE ACETILCOLINA nAChRs alpha 3, alpha 7 EN PACIENTES CON POLIPOSIS NASAL Y SU ASOCIACIÓN CON LA EXPOSICIÓN A HUMO DE TABACO

que sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de Ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional:

Núm. de Registro
R-2014-3502-57

ATENTAMENTE


DR.(A). GUILLERMO CAREAGA REYNA
Presidente del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud No. 3502

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

**A MIS PADRES QUE SIN USTEDES ESTE SUEÑO NUNCA HUBIERA SIDO POSIBLE POR
ENSEÑARME EL CAMINO CORRECTO, POR SU APOYO Y COMPRENSION.**

A DANY Y EDUARDO QUE A PESAR DE TODO SIEMPRE CAMINARON A MI LADO.

A MI FAMILIA POR TODO EL AMOR Y CARIÑO.

**A OSVALDO GRACIAS POR NUNCA DEJARME CAER Y ESTAR A MI LADO EN LOS
MOMENTOS MAS DIFICILES.**

A MI TUTORA DRA BEATRIZ MONTAÑO POR SU APOYO Y PACIENCIA.

DR. FRANCISCO GARCIA POR SUS ENSEÑANZAS Y COMPRENSION.

**A MIS MAESTROS OTORRINOLARINGOLOGOS POR ENSEÑARME A AMAR ESTA
HERMOSA ESPECIALIDAD.**

A MIS COMPAÑEROS RESIDENTES POR TANTAS ENSEÑANZAS DE VIDA.

GRACIAS.

CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN _____	7
ANTECEDENTES _____	9
OBJETIVO _____	15
PREGUNTA DE INVESTIGACION _____	15
HIPOTESIS _____	15
DEFINICION DE VARIABLES DE INTERES _____	16
MATERIAL Y MÉTODOS _____	19
RESULTADOS _____	24
DISCUSION _____	28
CONCLUSIONES _____	32
REFERENCIAS _____	33
ANEXOS	
Anexo 1 _____	39
Anexo 2 _____	40
Anexo 3 _____	42

RESUMEN

ANTECEDENTES: Se ha sugerido que el proceso inflamatorio es el mecanismo principal que desencadena la presencia de pólipos nasales y que pueden ser iniciados o agravados por la exposición ambiental a químicos y el humo de tabaco. Debido a la alta recidiva postquirúrgica 8-40% de los pólipos, y la carencia de conocimiento acerca de su fisiopatología en el que pueda estar involucrado el humo de tabaco, existen escasos estudios acerca de su asociación con el tabaquismo.⁹ Por otro lado se ha identificado la posible participación de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) (los cuales se unen a la nicotina que es uno de los principales productos de la combustión del humo de tabaco) en la regulación de la cascada de segundos mensajeros, en la proliferación celular, migración, y mediadores de la inflamación. Algunos de estos receptores se han identificado en un solo estudio en el epitelio nasal los nAChRs $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$ y $\beta 2$ ¹⁵ y se han relacionado con la proliferación celular^{16,17,18, 22} y que pudieran estar participando en el proceso de inflamación y posiblemente asociados a tabaquismo.

OBJETIVO

En la mucosa nasal de adultos con poliposis nasal, medir y comparar la expresión proteica de las subunidades de los receptores nicotínicos de acetilcolina nAChRs $\alpha 4$ (por inmunohistoquímica), en expuestos y no expuestos a humo de tabaco (por cuestionario).

MATERIAL Y MÉTODOS: Estudio transversal analítico prospectivo. Después de la autorización del protocolo de estudio por la Comisión Institucional de Investigación Científica y de Ética en Investigación, con el consentimiento informado de los pacientes, participaron en el estudio 45 sujetos portadores de poliposis nasal, 23 expuestos a humo de tabaco con consumo activo y 22 no expuestos a humo de tabaco. Los pacientes con diagnóstico de poliposis nasal que acudieron a la Consulta Externa del servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello, del Centro Médico Nacional La Raza, y fueron diagnosticados por su médico tratante quien los programó para tratamiento quirúrgico y que cumplieron con los criterios de selección y previa autorización de consentimiento informado. Después de la estandarización de los procedimientos, los pacientes que fueron programados para cirugía de resección de pólipos nasales vía

endonasal o vía endoscópica por sus médicos tratantes se registraron las características demográficas y clínicas de los pacientes. Antes de la cirugía programada se administró el cuestionario de la Encuesta Nacional de Adicciones. Luego se obtuvieron los bloques de parafina de las muestras tomadas. Un colaborador cegado a la respuesta obtenida del cuestionario, procesó las muestras por inmunohistoquímica para la determinación de los receptores nicotínicos alfa 4 (detección proteica de las subunidades $\alpha 4$ de los nAChRs) en el área de inmunohistoquímica del servicio de Patología del HG Centro Médico Nacional La Raza. Las evaluaciones se realizaron de manera cegada tanto de las evaluaciones de inmunohistoquímica y el análisis estadístico. Se solicitó el consentimiento informado, para la obtención e los bloques de parafina de las muestras tomadas durante el procedimiento quirúrgico y la aplicación de la Encuesta Nacional de Adicciones 2008. De acuerdo con la Ley General de Salud en materia de investigación en seres humanos se considera una investigación con riesgo menor al mínimo.

RESULTADOS. Se analizaron un total de 45 pacientes agrupados en 2 grupos: no expuestos a tabaquismo (y expuestos y a su vez subdivididos en grupo de fumadores activos y ex fumadores. La edad, tiempo de evolución clínica de poliposis nasal, peso, índice de masa corporal y relación hombre/mujeres en los dos grupos fueron similares en los dos grupos. Se evaluó el grado de ocupación de los pólipos en la región nasosinusal con la escala de Clasificación Lund Mackay tomográfica en todos los pacientes expuestos y no expuestos (promedio 7.64/7.45, DE 2.01/2.4 vs 6.7/7.39 DE 1.9/2.1) respectivamente, no encontrando diferencias estadísticamente significativas en los dos grupos (t Student, $p > 0.05$). Con respecto al porcentaje de expresión de las unidades de los receptores de acetilcolina nAChRs $\alpha 4$ cuando se comparó a los dos grupos de pacientes expuestos y no expuestos a humo de tabaco, el grupo de expuestos presentó una mayor cantidad de expresión del receptor alfa 4, (media de 84.3, DE 7.6, IC 95% 80.7-87.9 vs 72.3, DE 18.8 IC 95% 64.03-80.7) (ANOVA, $p > 0.05$).

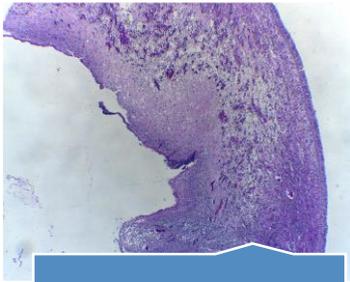
CONCLUSION. En este estudio se encontró en las muestras de pacientes con poliposis nasal expresión de receptores de acetilcolina nAChRs $\alpha 4$. En los pacientes expuestos a humo de tabaco el porcentaje de expresión de los receptores de acetilcolina nAChRs $\alpha 4$ fue mayor que en los no expuestos. Es indispensable buscar los posibles mecanismos de acción de los receptores de acetilcolina nAChRs $\alpha 4$ en el proceso inflamatorio de los pólipos y la intervención del humo de tabaco en su expresión.

ANTECEDENTES

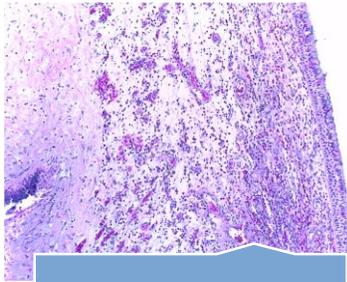
La poliposis nasal es una enfermedad inflamatoria de la nariz y senos paranasales, caracterizada por una degeneración edematosa multifocal y bilateral de la mucosa nasal y de los senos paranasales, que da lugar a lesiones polípedes lisas, gelatinosas, translúcidas y piroformes relacionada con múltiples factores de riesgo, además de la coexistencia de comorbilidades como la rinitis alérgica, NARES (síndrome de rinitis eosinofílica no alérgica)¹, el asma bronquial, Síndrome de Samter, mucoviscidosis y fibrosis quística, esta última más frecuente en población pediátrica. Constituye uno de los tumores benignos más frecuentes de la cavidad nasal entre el 2.1 – 4 %, se presenta más en hombres (54 al 73%) y en adultos.^{2,3}

Representa un problema porque ser una enfermedad recidivante que requiere múltiples cirugías y lo que eleva su costo, reportando porcentaje de 8% posterior a cirugía endoscópica vs polipectomía endonasal del 40%⁴ además que afecta la calidad de vida de los pacientes, con síntomas como obstrucción nasal, hiposmia, trastornos del sueño.²

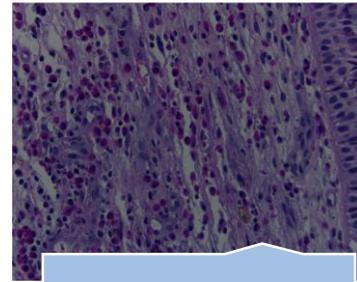
Existen múltiples teorías acerca de su origen, sin embargo el mecanismo fisiopatológico aún se desconoce. Las características principales de los pólipos son su estructura fibroedematosa y el infiltrado inflamatorio, se suelen observar otras anomalías como atipias celulares asociadas a placas de metaplasia; zonas de queratinización con metaplasia plana de las células cilíndricas. El epitelio podría participar en la inflamación de los pólipos a través de un mecanismo de secreción de mediadores diferentes de las citocinas, como derivados proinflamatorios del ácido araquidónico (leucotrienos y prostaglandinas), la participación de monóxido de nitrógeno, la presentación de proteínas de superficie del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (HLA-DR), y desde las proteínas de adhesión celular (ICAM-1); que atraerían localmente a las células inflamatorias. Se ha propuesto la teoría de la «ruptura epitelial» y la reparación anormal de la mucosa respiratoria, la ruptura de la continuidad epitelial y de la membrana basal condiciona que migren del tejido conjuntivo los fibroblastos y las células inflamatorias y el epitelio progresa a partir de los bordes del defecto en ambas direcciones.⁵ En otras predominan los eosinófilos activos en la tríada de Fernand Widal⁶ y los neutrófilos como en la mucoviscidosis y de las discinesias ciliares.⁷



Vista 4x



Vista 10x



Vista 40x

Pólipo de predominio eosinofílico, se identifica epitelio y pedículo vascular.

Su clasificación se realiza de forma clínica utilizando como métodos auxiliares, la endoscopia nasal y como método de imagen la tomografía computarizada. La clasificación tomografía más conocida es la realizada y publicada en 1995 por Lund Mackay y cols utilizando 5 ítems y se basa en el grado de ocupación de los senos paranasales y compromiso del complejo osteomeatal:

SENO PARANASAL	DERECHO	IZQUIERDO
FRONTAL	1= LIMPIO 2= PARCIALMENTE OPACIFICADO 3= OPACIFICACION COMPLETA	1= LIMPIO 2= PARCIALMENTE OPACIFICADO 3= OPACIFICACION COMPLETA
MAXILAR	1= LIMPIO 2= PARCIALMENTE OPACIFICADO 3= OPACIFICACION COMPLETA	1= LIMPIO 2= PARCIALMENTE OPACIFICADO 3= OPACIFICACION COMPLETA
ETMOIDES ANTERIOR	1= LIMPIO 2= PARCIALMENTE OPACIFICADO 3= OPACIFICACION COMPLETA	1= LIMPIO 2= PARCIALMENTE OPACIFICADO 3= OPACIFICACION COMPLETA
ETMOIDES POSTERIOR	1= LIMPIO 2= PARCIALMENTE OPACIFICADO 3= OPACIFICACION COMPLETA	1= LIMPIO 2= PARCIALMENTE OPACIFICADO 3= OPACIFICACION COMPLETA
ESFENOIDES	1= LIMPIO 2= PARCIALMENTE OPACIFICADO 3= OPACIFICACION COMPLETA	1= LIMPIO 2= PARCIALMENTE OPACIFICADO 3= OPACIFICACION COMPLETA
COMPLEJO OSTEOMEATAL	0= LIMPIO 2= OBSTRUIDO	0= LIMPIO 2= OBSTRUIDO
TOTAL		

Clasificación Lund Mackay

TABAQUISMO

El consumo de tabaco y la exposición al humo se mantiene como la primera causa de muerte prevenible a nivel mundial, según la Organización Panamericana de la Salud (OPS 2013) hay 145 millones de fumadores (que representan el 12% del total mundial) y se estima que alrededor de un millón de personas pierde la vida como consecuencia del tabaco cada año. A nivel nacional en la población de 12 a 65 años se estima que 21.7% de la población mexicana es fumadora activa (31.4% de los hombres y 12.6% de las mujeres); 26.4% son ex fumadores (30.9% de los hombres y 22.2% de las mujeres), y 51.9% nunca han fumado (37.8% de los hombres y 65.2% de las mujeres). En términos absolutos, se estima que 17.3 millones de mexicanos entre 12 y 65 años son fumadores activos (12 millones de hombres y 5.2 millones de mujeres), 21 millones son ex fumadores y cerca de 41.3 millones nunca han fumado.

Se ha sugerido que el proceso inflamatorio, es el mecanismo principal de los pólipos nasales, que pueden ser iniciados o agravados por la exposición ambiental o químicos ocupacionales.⁸ Aunque el rol del tabaco no es evidente, Houser and Keen⁹ encontró que el 30.2% de los pacientes con poliposis nasales fueron fumadores actuales, estos autores encontraron una asociación significativa entre el uso de tabaco y la pólipos nasales pero no entre los siempre fumadores y nunca fumadores. La prevalencia de poliposis nasal fue más alta en los fumadores fuertes, sin alergia que aquellos con alergia. Otros estudios han señalado su relación con la alergia, y el tabaquismo

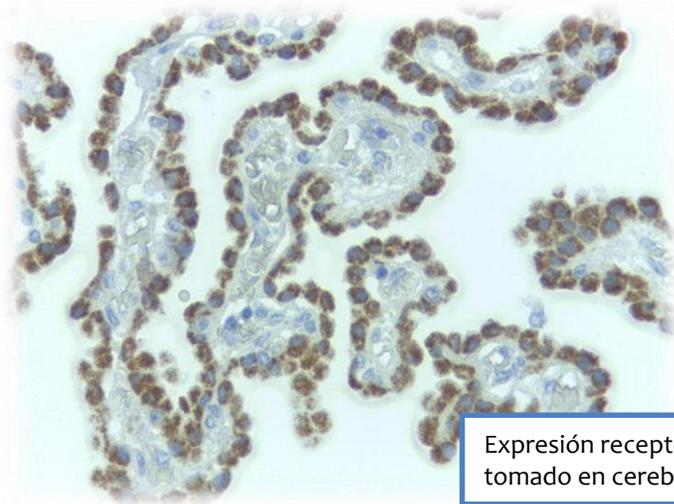
RECEPTORES DE ACETILCOLINA

La acetilcolina es una sustancia que fue identificada de primera intención en tejido neural y con sus receptores que más tarde fueron identificados en otros tejidos. Sus efectos farmacológicos se dividen como “muscarínicos” o “nicotínicos” según fueran reproducidos por los alcaloides muscarina o nicotina, respectivamente. Estas sustancias actúan uniéndose a moléculas receptoras e induciendo la consiguiente respuesta. Los receptores muscarínicos se caracterizan por respuestas prolongadas que son el resultado de interacciones con sistemas de segundos mensajeros a través de las denominadas proteínas G. Por el contrario, las respuestas nicotínicas son rápidas y breves, ya que el

neurotransmisor se une al receptor y provoca rápidos cambios en su estructura que conducen a la apertura de un poro iónico, selectivo para cationes.

El receptor nicotínico está compuesto por cinco cadenas polipeptídicas denominadas α , β , γ y δ , con dos copias de α por molécula de receptor.

Sus principales características son: a) el receptor es un pentámero que atraviesa la membrana con todas sus subunidades, b) el sitio de unión de acetilcolina y de otros agonistas y antagonistas reside principalmente en las subunidades α , c) una vez purificado, el receptor es capaz de ensamblarse en membranas lipídicas artificiales y reconstituir su función translocadora de iones al ser activado con agonistas, y d) el poro iónico parece estar localizado en el centro de la molécula de receptor y a su formación contribuye el humo de tabaco. La nicotina se une a receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) lo que activa receptores en las terminaciones nerviosas lo que desencadena múltiples respuestas inmunomoduladoras, entre las cuales involucran alteraciones en el transporte del calcio lo que de forma secundaria conduce a presencia de edema en la mucosa nasal, respuesta inflamatoria lo que se inicia con la activación de macrófagos, y cambios en las células de la mucosa nasal aumentando la cantidad de células ciliadas y su función.¹⁵



Expresión receptor alfa 4 control
tomado en cerebro de ratón

RECEPTORES DE ACETILCOLINA nAChRs α 3, α 4, α 7 y PROLIFERACION CELULAR

Con respecto a la proliferación celular, uno de los receptores más estudiados es el nAChR α 7 relacionado a la participación en el cáncer de pulmón¹⁶, funciona como un canal de iones con alta permeabilidad a Ca^{2+} y Sodio (Na^{+}) que se activa ante la presencia de nicotina y NKK^{17,18} tiene agonistas selectivos como la metilconitina y la α -Bgtx, que atenúan los efectos proliferativos de la nicotina. Se ha identificado que la nicotina y otros derivados carcinogénicos como la 4 (metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) se unen a receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) lo que implica que puedan inducir proliferación celular¹⁹, así como la presencia de α 3 en linfocitos T humanos en líneas celulares (Jurkat, Molt4 y H9), en timo en células epiteliales afecta la proliferación de células T, la diferenciación y los procesos de selección y así como en la piel en los queratinocitos epidérmicos humanos, principalmente por la regulación de calcio, vías paracrin-autocrinas de la acetilcolina.^{20,21} La estimulación nicotínica induce a la secreción de neurotransmisores e incrementa la proliferación celular, síntesis y liberación de ACh. In vitro la estimulación con nicotina a corto y largo plazo se mostró que promueve la proliferación celular, un efecto que depende del influjo de calcio que activa MAP y Akt cinasas. Los receptores α 3/ α 4 y β 2 se han involucrado en el desarrollo de cáncer de pulmón debido a activación rápida del Akt/PI3-K (fosfatidilinositol 3-cinasa) que lleva a la activación de factores de crecimiento o de proteínas Ras (interruptores-reguladores moleculares importantes en rutas de señalización celular) y con esto aumento en la proliferación celular.²²⁻²⁸ Además, la activación de la vía MAP cinasa,²⁹ asociado a la activación de la vía Rb-Raf 1/ERK otra vía de señalización relacionada a la proliferación celular.^{30,31}

Solo hay un estudio realizado en muestras de mucosa nasal de cornete medio e inferior de 6 sujetos sin enfermedad nasal y 18 pacientes con sinusitis crónica, poliposis y alergia nasal, se midieron PCR-R (reacción en cadena de transcriptasa reversa de la polimerasa) las subunidades para nAChRs α (α 1, α 2, α 3, α 4, α 6, α 7) y β (β 2, β 3, β 4), identificando que las subunidades α 3, α 7 y β 2 se expresaron en un 92%, 88% y 75% de los sujetos. Identificando una asociación entre el tipo de tejido y β 4 y de género y β 3. Sugiriendo que las células de la mucosa nasal expresan nAChR subunidades de RNA mensajeros.¹⁵

Cabe mencionar que para la localización de moléculas proteicas, receptores o todo aquello susceptible de ser antígeno en secciones de tejido se utiliza la inmunohistoquímica (IHQ), definida como la identificación de un constituyente de tejido in situ por medio de reacción antígeno anticuerpo, etiquetado por una marca microscópicamente visible.^{32-36.}

Debido a la alta recidiva postquirúrgica 8-40% de los pólipos, y la carencia de conocimiento acerca de su fisiopatología en el que pueda estar involucrado el humo de tabaco, existen escasos estudios acerca de su asociación con el tabaquismo.⁹ Por otro lado se ha identificado la posible participación de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) (los cuales se une a la nicotina que es uno de los principales productos de la combustión del humo de tabaco) en la regulación de la cascada de segundos mensajeros, en la proliferación celular, migración, y mediadores de la inflamación. Algunos de estos receptores se han identificado en un solo estudio en el epitelio nasal epitelio nasal los nAChRs $\alpha 3$, $\alpha 7$ y $\beta 2$ se expresaron en un 92%, 88% y 75% respectivamente en muestras de mucosa nasal de cornete medio e inferior de 6 sujetos sin enfermedad nasal y 18 pacientes con sinusitis crónica, poliposis y alergia nasal por transcripción de la reacción en cadena de transcriptasa reversa de la polimerasa las subunidades.¹⁵ El receptor nAChRs $\alpha 7$ es el más estudiado y se ha relacionado a la proliferación celular,^{16 17 y 18,} y el nAChRs $\alpha 3$ ha sido menos estudiado y está involucrado en la activación de factores de crecimiento y proliferación celular.²² Por lo tanto, es posible que estos receptores, aunque hasta ahora como ya se mencionó solo hay un estudio en el que se han identificado, pudieran estar participando en el proceso de inflamación y posiblemente asociados a tabaquismo además que no se midió su expresión proteica tanto en sujetos con y sin poliposis nasal. Es muy limitada la información en nariz por lo que se debe obtener este conocimiento para la adecuada interpretación de los resultados y sirvan de sustento para otros estudios en la misma línea.

OBJETIVO

En la mucosa nasal de adultos con poliposis nasal, medir y comparar la expresión proteica de las subunidades de los receptores nicotínicos de acetilcolina nAChRs $\alpha 4$ (por inmunohistoquímica), en expuestos y no expuestos a humo de tabaco (por cuestionario).

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿En la mucosa nasal de adultos con poliposis nasal, cuál es la diferencia en la expresión proteica de las subunidades de los receptores nicotínicos de acetilcolina nAChRs $\alpha 4$ de acuerdo a la exposición o no a humo de tabaco?

HIPOTESIS

En la mucosa nasal de adultos con poliposis nasal, la expresión proteica de las subunidades de los receptores nicotínicos de acetilcolina nAChRs $\alpha 4$ es mayor en los expuestos a humo de tabaco que en los no expuestos.

DEFINICION DE VARIABLES DE INTERES

VARIABLE INDEPENDIENTE

-Exposición a humo de tabaco

Con 2 categorías: Expuesto (pasivo o activo) o No expuesto

Definición conceptual. Expuesto: Es aquel individuo que se expone a los productos de la combustión del humo del tabaco, ya sea de forma pasiva o activa. En forma pasiva, cuando es un no fumador que se expone a los productos de la combustión del tabaco en el ambiente. En forma activa, cuando fuma más de 5 cigarrillos diarios o ha fumado más de 100 cigarros en la vida. No expuesto: Es aquel individuo que no se expone a los productos de la combustión del humo del tabaco.

Definición operacional. Para este estudio, se aplicó la Encuesta Nacional de Adicciones (2008)³⁷ al paciente (previa estandarización), para identificar si el paciente se expone o no de manera habitual a humo de tabaco de acuerdo con la definición conceptual y, en su caso las características de la exposición (activa o pasiva).

Indicadores. Respuestas de la Encuesta Nacional de Adicciones, expuestos o no expuestos (en su caso pasiva o activa) (anexo 3).

Escala de medición. Dicotómica.

Con 2 categorías: Expuesto (pasivo o activo) o No expuesto

VARIABLE DEPENDIENTE

- Cantidad de expresión de proteica de las subunidades de los receptores nicotínicos de acetilcolina nAChRs α 3, 4 y 7 en pólipos.

Definición conceptual. Cantidad: Propiedad de lo que es capaz de número y medida. Los receptores nicotínicos constituyen una familia heterogénea de canales de iones. La presencia de estos receptores se ha relacionado con la regulación de la cascada de segundos mensajeros, en la proliferación celular, migración, y mediadores de la inflamación. El receptor nicotínico está compuesto por cinco cadenas polipeptídicas denominadas a, b, g y d, con dos copias de a por molécula de receptor. El receptor es un pentámero que atraviesa la membrana con todas sus subunidades, es el sitio de unión de

acetilcolina y de otros agonistas y antagonistas reside principalmente en las subunidades α , es capaz de ensamblarse en membranas lipídicas artificiales y reconstituir su función translocadora de iones al ser activado con agonistas, y el poro iónico parece estar localizado en el centro de la molécula de receptor y a su formación contribuyen todas las subunidades. Se han identificado las siguientes subunidades para nAChRs α (α 1, α 2, α 3, α 4, α 6, α 7) y β (β 2, β 3, β 4).

Definición operacional: Los receptores nAChRs α 3, 4 y 7 , confines de tesis se medirá la expresión del alfa 4, se identificaran a través de inmunohistoquímica de la cantidad de expresión proteica de los receptores alfa 4, con el anticuerpo α 4 (Nicotinic Acetylcholine Receptor alpha 4 antibody [319]. Monoclonal. ab24644. Abcam. Cambridge, RU). Las muestras se observaron en un foto-microscopio de campo claro (Leyca ICC 50 HD) con el objetivo de 4X, 10X y 40X. Se seleccionarán 10 campos al azar con el objetivo de 40X para determinar 1mm por cada sujetos y cuantificar la expresión proteica, de acuerdo a la positividad que se considerará si se tiñe de color café (DAB). La determinación de la cantidad de expresión proteica de los receptores nAChRs α 4 se realizó por dos observadores ciegos a la procedencia de la muestra, previa estandarización.

Indicador: La cantidad de expresión proteica de los receptores fueron los que se obtuvo positividad (color café) a nAChRs α 4, se cuantificaron 10 campos al azar mediante microscopia directa 40x.

Escala de mediciónn. Cuantitativa discreta.

VARIABLES DEMOGRAFICAS.

- Edad.

Definición Conceptual. Medida de duración de vivir, lapso de tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta el instante o periodo que se estima de existencia de una persona.

Definición operacional. Se identificaron de acuerdo con lo que informó el paciente y los dos últimos dígitos del número de filiación institucional.

Indicadores. Se expresaron en años cumplidos.

Escala de mediciónn. Cuantitativa discreta.

- Sexo.

Definición Conceptual. Diferencia física y de conducta que distingue a los organismos individuales, según las funciones que realizan en los procesos de reproducción y se dividen en hombres y mujeres.

Definición operacional. Las que se observaron según las características fenotípicas del paciente y por la letra especificada en los últimos dígitos de la afiliaciónn según corresponda la letra "M" o "F".

Indicadores. Se expresaron con la letra "M" masculino, "F" femenino.

Escala de medición: Cualitativa nominal.

- Ocupación.

Definición Conceptual. Trabajo o cuidado que impide emplear el tiempo en otra cosa. Acción o efecto de ocupar.

Definición operacional. Se considerará de acuerdo a lo que refiera el paciente.

Indicadores. Se expresaron en estudiante, obrero (área de trabajo), empleado (técnico o profesional), empleador u otro.

Escala de medición: Cualitativa nominal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Universo de trabajo

Se realizó un estudio analítico, trasversal y prospectivo. Después de la autorización del protocolo de estudio por la Comisión Institucional de Investigación Científica y de Ética en Investigación, con el consentimiento informado de los pacientes, participaron en el estudio 45 sujetos portadores de poliposis nasal, 23 expuestos a humo de tabaco, con exposición activa y 23 no expuestos a humo de tabaco, se excluyeron 7 pacientes 5 por historial clínico completo y dos por muestras mal fijadas. Los pacientes con diagnóstico de poliposis nasal que acudieron a la Consulta Externa del servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello, del Centro Médico Nacional La Raza, y que fueron diagnosticados por su médico tratante quien los programó para tratamiento quirúrgico y que cumplieron con los criterios de selección. Se incluyeron pacientes mayores de 20 años de edad, sin diferencia entre sexo masculino y femenino, con previo consentimiento quirúrgico y que aceptaron participar en el estudio. No se incluyeron pacientes que no contaron con pruebas de alergia, antecedente de fibrosis quística y síndrome de samter, además de antecedentes de otras enfermedades nasosinusales (sinusitis crónica, tumores), muestras que no contaron con los criterios histopatológico deseados como muestras incompletas o mal fijadas, y que no se sustentara enfermedad alérgica.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Después de la estandarización de los procedimientos, los pacientes que fueron programados para cirugía de resección de pólipos nasales vía endonasal o vía endoscópica por sus médicos tratantes, y cumplieron con todos los criterios de selección se les invitó a participar en el estudio. Se registraron las características demográficas y clínicas de los pacientes. Antes de la cirugía programada se administró el cuestionario de la Encuesta Nacional de Adicciones 2008. Luego se obtuvo una muestra del tejido de pólipos que se retiraron durante el procedimiento quirúrgico, previo consentimiento y explicación que se obtuvo por su médico tratante. Todas las muestras obtenidas se colocaron en formol al 10% y luego se procesaron en parafina y se guardaron los bloques

hasta completar el tamaño de la muestra. Un colaborador cegado a la respuesta obtenida del cuestionario, procesó las muestras por inmunohistoquímica para la determinación de los receptores nicotínicos alfa 3, 4 y 7, con respecto al receptor alfa 3 y 7 sólo se realizó hasta la estandarización de la técnica y con fines de tesis se continuó con el estudio con el procesamiento de las muestras para alfa 4 (detección proteica de las subunidades $\alpha 4$ de los nAChRs) en el área de inmunohistoquímica del servicio de Patología del HG Centro Médico Nacional La Raza. Cálculo para el tamaño de la muestra de acuerdo a la prevalencia de receptores en no fumadores de $\alpha 3$ del 85%, 4 del 89% y de $\alpha 7$ del 92%¹⁵, con un nivel de confianza bilateral de 0.95 y una precisión de 0.2. Total de sujetos 21 pacientes para cada grupo.

PROCEDIMIENTO

Cuestionario

A cada participante se le administró de manera directa por el cuestionario de la Encuesta Nacional de Adicciones 2008 (Comyern 2008)³⁷ ya validada en población mexicana, para identificar la exposición o no a humo de tabaco, previa estandarización, hasta el momento de la cirugía, del servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello CMN La Raza.

Obtención y procesamiento de muestras de pólipos

De los pólipos que se retiraron de la cirugía por su médico tratante se obtuvieron los bloques de parafina y se almacenaron hasta completar el tamaño de la muestra.

Cuantificación de la expresión proteica de los receptores nicotínicos.

Las mediciones se efectuaron en el Departamento de Inmunohistoquímica de servicio de Patología del HG CMN La Raza. Para la determinación de la cantidad de expresión proteica del receptor de acetilcolina nAChRs $\alpha 4$. Se utilizó mediante inmunohistoquímica el anticuerpo $\alpha 4$ (Nicotinic Acetylcholine Receptor alpha 4 antibody. Polyclonal. ab65181. Abcam. Cambridge, RU). Las muestras teñidas que fueron procesadas se fotografiaron en el microscopio. Con el objetivo 40X en al azar. Se identificó la cantidad de expresión de los receptores de acuerdo a la positividad. Luego dos observadores previa estandarización

(FJGV INP y Patólogo de La Raza) y sin conocer si las muestras pertenecen al grupo de expuestos y no expuestos.

Procedimiento de Inmunohistoquímica:

1) Previa estandarización del anticuerpo primario se realizaron diluciones a 1:10, 1:50, 1:100, 1:150, estandarizado con cerebro de ratón, hasta obtener tinción mostrada en la hoja técnica del anticuerpo. Se obtuvieron de los cortes de tejido con parafina en las laminillas a las cuales se les realizó el proceso de desparafinización, introduciendo durante 30 minutos en estufa a 59°C.

2) Se realizan lavados con: 1) 2 lavados de xileno de 3 minutos cada uno, 2) xileno en dilución 1:1 con etanol al 100% por 3 minutos, 3) etanol al 100% en 2 ocasiones por 3 minutos cada una, 4) etanol al 95% por 3 minutos, 5) etanol al 70% por 3 minutos, 6) etanol al 50% por 3 minutos y 7) enjuagar con agua destilada manteniendo los portaobjetos en ella hasta tener lista la preparación para la recuperación de antígenos evitando que se sequen.

3) La exposición de antígenos se llevó a cabo con la solución Immuno/DNA retriever with citrate (Bio SB, Cat BSB 0021) en olla de presión, colocando las muestras en vasos de Koplín y posteriormente colocadas a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con agua destilada y amortiguador de Tris-HCl 0.01 M (Tris) durante 4 minutos.

4) En seguida se bloqueó la peroxidasa endógena con el peróxido de hidrógeno al 0.9% por 5 minutos a temperatura ambiente y se realizaron lavados con amortiguador Tris durante 4 minutos, posteriormente se incubaron los cortes con albúmina sérica bovina 0.1% durante 30 minutos a temperatura ambiente.

5) Sin dejar secar el tejido se le agregó el anticuerpo primario diluido (anti - receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 4$), cada anticuerpo se colocó en 5 laminillas de manera independiente. Se dejó incubar toda la noche en cámara húmeda a 4 grados centígrados (°C)

6) Después de la incubación se realizó lavado con Tris durante 4 minutos, se agregó el sistema detector del anticuerpo biotinilado (Mouse/Rabbit inmunodetector biotin-link), dejándolo 30 minutos y en seguida lavado con Tris durante 4 minutos. Posteriormente se colocó la estraptavidina-HRP (Mouse/Rabbit inmunodetector HRP Label) durante 30 minutos a temperatura ambiente seguido de un lavado en Tris durante 4 minutos.

7) Finalmente se agregó 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) en Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) al 2% monitoreando la reacción y deteniendo la reacción con agua destilada. Posteriormente

los tejidos se tiñeron con hematoxilina seguido de la deshidratación con alcoholes: 1) etanol al 50% por 3 minutos 2) etanol al 70% por 3 minutos 3) etanol al 95% por 3 minutos 4) etanol al 100% en 2 ocasiones por 3 minutos cada una 5) 2 baños de xileno. Se montan en resina Permount y se observaron al microscopio óptico. Una reacción colorida café indicó una reacción positiva.

8) Se tomó como control negativo para los nAChR $\alpha 4$: tejido de corazón sin enfermedad, debido a que en este tejido no se cuenta con reportes de expresión de los receptores y como control positivo tejido cerebral.

Procesamiento de Datos

Los resultados de cada una de las determinaciones se registraron en la hoja de recolección de datos. Después se concentró la información en una hoja de cálculo (Excel 2000, Microsoft, Palo Alto) para efectuar su análisis estadístico mediante el programa computado CSS (Statsoft, Tulsa).

- ANALISIS ESTADÍSTICO.

Se realizó estadística descriptiva de acuerdo a la distribución de los datos con medidas de tendencia central y de dispersión así como estadística analítica con prueba de T Student, ANOVA y correlaciones bivaridas, según corresponda con nivel de significancia de 0.05.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

No de autorización R-2014-3502-57. Se solicitó consentimiento para realizar el cuestionario del estatus de tabaquismo y la obtención de una muestra del tejido que se extrae por su médico tratante con fines de diagnóstico y tratamiento. Para realizar la detección proteica de las subunidades de los receptores nicotínicos de acetilcolina nAChRs mediante inmunohistoquímica. De acuerdo con la Ley General de Salud en materia de investigación en seres humanos se consideró una investigación con riesgo mínimo, se realizará en sujetos adultos. Los procedimientos a realizar se apegaron a las normas éticas, al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y a la Declaración de Helsinki y sus enmiendas. El posible beneficio de este estudio fue identificar los factores que contribuyen a la presentación de los pólipos. Se garantizó la

confidencialidad de la información ya que se utilizaron códigos y en caso de publicación no se identificará a los sujetos. El consentimiento se obtuvo por los investigadores participantes (BBMV y DL) quienes deseen participar en el estudio de los sujetos que se identificaron que cumplieron con los criterios de selecciónn candidatos a cirugía programados por sus médicos tratantes elegidos de manera consecutiva y se les menciono que se planea guardar muestras potencialmente útiles para otros estudios relacionados con la línea de investigación, por un año más en el caso de que se generara alguna hipótesis de novo para este estudio y completar las determinaciones del alfa 3 y 7, sin afectación del paciente o del paciente que no tiene pólipos.

RESULTADOS

Se analizaron un total de 45 pacientes agrupados en 2 grupos: no expuestos a tabaquismo y expuestos. El grupo de pacientes no expuestos a humo de tabaco se encontraban en un rango de edad entre 20 y 72 años de edad con un promedio de 47.91 DE 15.09, el grupo de expuestos se encontraba en un rango de edad entre 27-75 años con un promedio de 49.05 DE 15.09, con un total de 24 mujeres y 21 hombres, grupo de expuestos 14 de sexo masculino y 9 de sexo femenino. La edad, tiempo de evolución clínica de poliposis nasal, peso, índice de masa corporal y relación hombre/mujeres en los dos grupos fueron similares en los dos grupos (Tabla 1).

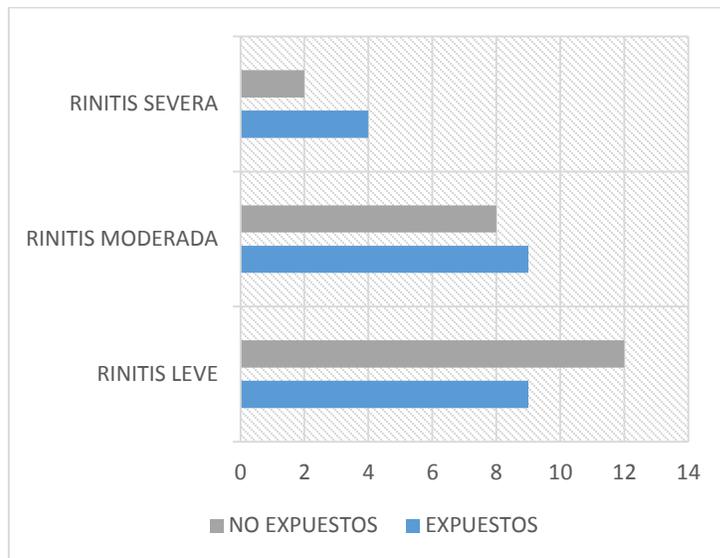
Tabla 1. Características de los 45 pacientes		
Características de los pacientes	Exposición a humo de tabaco	NO Exposición a humo de tabaco
	(n=23)	(n=22)
	n (D.E.)	n (D.E.)
Edad (años)	49.05 (10.33)	47.91 (15.09)
IMC (kg/m ²)	26.35 (2.9)	26.64 (2.9)
Sexo (razón Femenino/Masculino)	9/14	15/7
Tiempo de evolución poliposis nasal (años)	6.45 (5.30)	8(6.85)

D.E. Desviación Estándar n Numero de pacientes en promedio

Del grupo de expuestos a humo de tabaco el 43.4% (n 10) estuvieron expuestos durante los 2 días anteriores al procedimiento quirúrgico, y el 56.5 % (n13) durante 30 días previos, considerándose fumadores activos de acuerdo a la Encuesta Nacional de Adicciones. Del grupo de los pacientes no expuestos a humo de tabaco el 100% (n 23) refiere nunca haber estado expuesto a humo de tabaco durante el último año y en los dos últimos días.

Los pacientes del grupo de exposición a humo de tabaco así como los del grupo de no expuestos, fueron clasificados por lo médicos Alergólogos de los expuestos en rinitis leve (n 22, % 48.8), moderada (n 17, 37.7%) o severa (n 6, 13.3%), Tabla 2.

TABLA 2. Clasificación del tipo de rinitis alérgica de los pacientes expuestos y no expuestos a humo de tabaco.



Se evaluó el grado de ocupación de los pólipos en la región nasosinusal con la escala de Clasificación Lund Mackay tomográfica, en todos los pacientes expuestos y no expuestos a humo de tabaco (promedio 7.64/7.45, DE 2.01/2.4 vs 6.7/7.39 DE 1.9/2.1) respectivamente, no encontrando diferencias estadísticamente significativas en los dos grupos (t Student, $p > 0.05$). De acuerdo al grado de obstrucción nasal evaluada de manera clínica por los médicos tratantes de los pacientes, en los dos grupos evaluados el grado de obstrucción fue similar en ambos grupos (promedio 65/73 DE 22.8/23.7 vs 71/74 DE 20.5/18.8)(t Student $p > 0.05$).

Con respecto al porcentaje de expresión de las unidades de los receptores de acetilcolina nAChRs $\alpha 4$, cuando se comparó a los dos grupos de pacientes expuestos y no expuestos a humo de tabaco, el grupo de expuestos presentó una mayor cantidad de expresión del receptor de acetilcolina nAChRs $\alpha 4$, (media de 84.3, DE 7.6, IC 95% 80.7-87.9 vs 72.3, DE 18.8 IC 95% 64.03-80.7) (ANOVA, $p > 0.05$). En la figura 1 se identifica la expresión de

las subunidades de los receptores de acetilcolina nAChRs $\alpha 4$ en pacientes expuestos y no expuestos. En la figura 2 se identifica el porcentaje de expresión del receptor de acetilcolina nAChRs $\alpha 4$ en el grupo de expuestos y no expuestos a humo de tabaco.

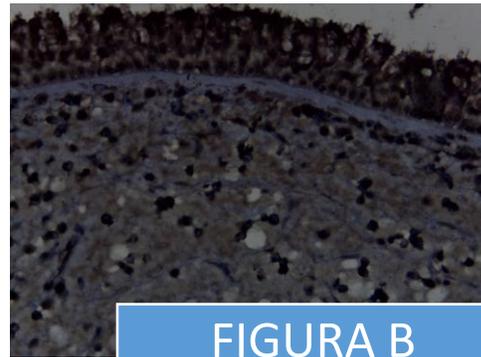
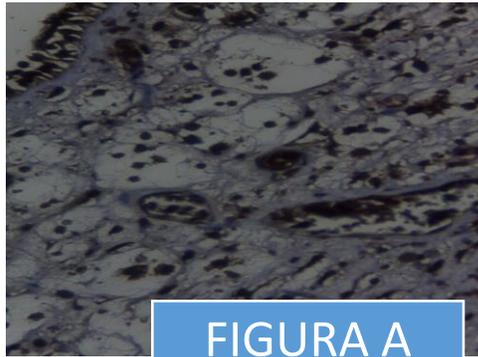


Figura 1. A) Expresión en paciente no expuesto B) Expresión en paciente expuesto.

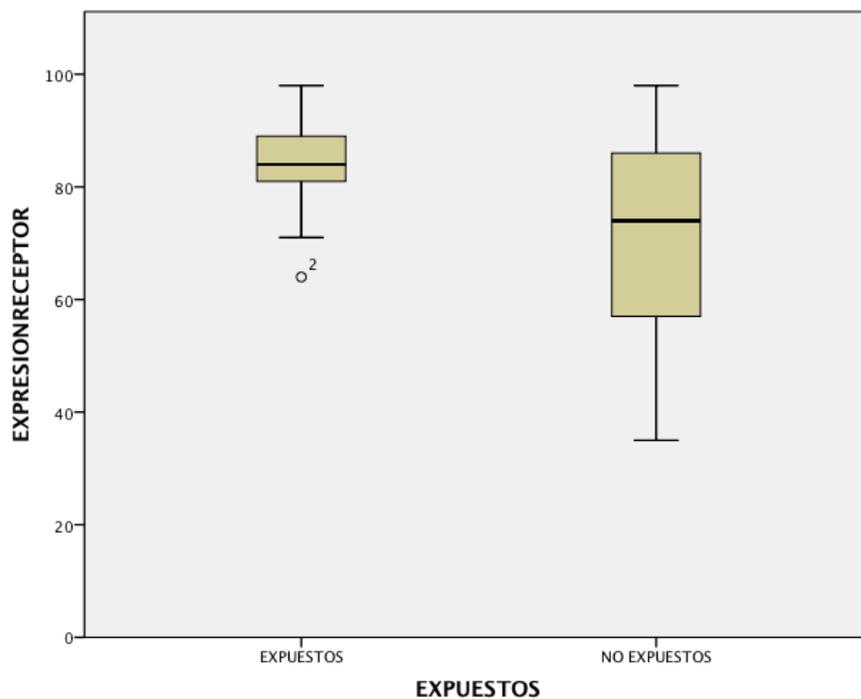


Figura 2. Porcentaje de expresión del receptor alfa 4 en los pacientes expuestos y no expuestos a humo de tabaco.

Se identificó una correlación de la expresión de los receptores de acetilcolina nAChRs $\alpha 4$ con el índice tabáquico en los pacientes expuestos a humo de tabaco (r Pearson, $p < 0.01$).

DISCUSION

En este estudio se identificó la presencia del receptor de acetilcolina nAChRs $\alpha 4$ en todos los pacientes con poliposis nasal. El grupo de expuestos a humo de tabaco presentaron un incremento en el porcentaje de expresión de este receptor cuando se comparó con los no expuestos.

La presencia de pólipos nasales en los pacientes, genera un problema de salud, debido a su alta frecuencia de recidiva y que conllevan a múltiples resecciones quirúrgicas con el riesgo de posibles complicaciones transoperatorias, y aunado al tratamiento médico a largo plazo generando altos costos, además de la comorbilidad a la que conllevan, lo que afecta su calidad de vida ⁸.

Se ha intentado explicar la fisiopatología de los pólipos para tratar de controlar la enfermedad. Se conoce poco acerca de la fisiopatología, se identifica la participación de los eosinófilos y sus moléculas que conllevan a su migración, permanencia y activación como la interleucina (IL-5), el factor estimulante de colonias de macrófago granulocitos (GM-CSF) así como las quimiocinas eotaxina (EO) y los denominados RANTES. Participan los mastocitos y neutrófilos (IL-8 y activación neurogénica). También a una mayor concentración de células ciliadas, células caliciformes, células basales, células intermedias, células en cepillo y células neuroendocrinas que generan factores proinflamatorios (leucotrienos y prostaglandinas derivados del ácido araquidónico), además de la sobreexpresión de proteínas de superficie del complejo mayor de histocompatibilidad y de proteínas de adhesión celular y como resultado la señal para la cascada inflamatoria ⁴⁰.

Se ha identificado la posible participación de humo de tabaco en la poliposis nasal como factor inflamatorio, sin obtener resultados concluyentes que expliquen su posible mecanismo de acción⁴¹. Aunque clínicamente no encontramos una mayor severidad de la obstrucción de los pólipos en los expuestos comparados con los no expuestos a humo de

tabo, sería importante estudiar si hay diferencia en la participación de células o moléculas inflamatorias ante la exposición *in vitro* o *in vivo* del humo de tabaco o sus productos como la nicotina.

Existe la posible teoría de la participación de los polimorfismos del receptor nicotínico alfa 4 genera predisposición genética para el desarrollo de adicción a la nicotina (CHRNA4 rs1044396 y rs1044397) y su relación con una edad de inicio más temprana del tabaquismo.⁴² La nicotina es el principal producto del humo de tabaco. Se ha sugerido que la nicotina activa los receptores nicotínicos⁴³. Los receptores de acetilcolina por sus efectos farmacológicos se dividen como muscarínicos o nicotínicos según fueran reproducidos por los alcaloides muscarina o nicotina, respectivamente. El receptor nicotínico está compuesto por cinco cadenas polipeptídicas denominadas α , β , γ y δ , con dos copias de α por molécula de receptor.

La nicotina se une a receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) lo que activa receptores en las terminaciones nerviosas lo que desencadena múltiples respuestas inmunomoduladoras, entre las cuales involucran alteraciones en el transporte del calcio lo que de forma secundaria conduce a presencia de edema en la mucosa nasal, respuesta inflamatoria lo que se inicia con la activación de macrófagos, y cambios en las células de la mucosa nasal aumentando la cantidad de células ciliadas y su función.¹⁵

Con respecto a la proliferación celular, existen casi nulos estudios con respecto al nAChR $\alpha 4$. Uno de los receptores más estudiados es el nAChR $\alpha 7$ relacionado a la participación en el cáncer de pulmón¹⁶, funciona como un canal de iones con alta permeabilidad a Ca^{2+} y Sodio (Na^+) que se activa ante la presencia de nicotina y NKK^{17,18} tiene agonistas selectivos como la metilconitina y la α -Bgtx, que atenúan los efectos proliferativos de la nicotina. Se ha identificado que la nicotina y otros derivados carcinogénicos como la 4 (metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) se unen a receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) lo que implica que puedan inducir proliferación celular¹⁹, así como la presencia de $\alpha 3$ en linfocitos T humanos en líneas celulares (Jurkat, Molt4 y H9), en timo en células epiteliales afecta la proliferación de células T, la diferenciación y los procesos de selección y así como en la piel en los queratinocitos epidérmicos humanos, principalmente por la regulación de calcio, vías paracrina-autocrina de la acetilcolina.^{20,21} La estimulación nicotínica induce a la secreción de neurotransmisores e incrementa la

proliferación celular, síntesis y liberación de ACh. In vitro la estimulación con nicotina a corto y largo plazo se mostró que promueve la proliferación celular, un efecto que depende del influjo de calcio que activa MAP y Akt cinasas.

Con respecto al receptor nAChR $\alpha 4$, los receptores $\alpha 3/\alpha 4$ y $\beta 2$ se han involucrado en el desarrollo de cáncer de pulmón debido a activación rápida del Akt/PI3-K (fosfatidilinositol 3-cinasa) que lleva a la activación de factores de crecimiento o de proteínas Ras (interruptores-reguladores moleculares importantes en rutas de señalización celular) y con esto aumento en la proliferación celular.²²⁻²⁸. Además, la activación de la vía MAP cinasa,²⁹ asociado a la activación de la vía Rb-Raf 1/ERK otra vía de señalización relacionada a la proliferación celular.^{30,31} Se ha identificado la presencia del receptor nicotínico alfa 4 en linfocitos T humanos, en células B, actúan en la proliferación celular, diferenciación y procesos de selección. Estimulan el crecimiento y disminuyen la producción de anticuerpos. Sitio más común de presentación en el SNC⁴². En pulmón en células epiteliales alveolares y células neuroepiteliales²⁴. En líneas celulares semejantes a músculo esquelético.

Existen pocos estudios realizados en mucosa nasal aún más ante la presencia de pólipos y la identificación del receptor de acetilcolina nAChRs $\alpha 4$ y su relación con el humo de tabaco.

En el estudio de Kieger y cols.¹⁵ en el cual identifica la expresión de receptores nicotínicos alfa 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, beta 2, 3, 4 y CAT (acetilcolina transferasa), CRN (carnitina acetil transferasa), y GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y OMP (marcador de proteína olfatoria), con el método de PCR-RT en 24 muestras de la mucosa nasal del cornete inferior, medio de sujetos sanos (6 muestras sujetos) y con enfermedad nasosinusal como poliposis (4 muestras de pacientes), sinusitis crónica (11 muestras de pacientes), desviación septal (una muestra de paciente), alergia crónica severa (una muestra) y con quiste nasofaríngeo (una muestra). Encontraron la expresión de receptores alfa 1,2,3,4,6,7 y beta 2, 3 y 4 de manera general, sin embargo, la presencia del receptor alfa 4, se encontró en mucosa nasal en 4 de los 6 sujetos sanos, uno de ellos fumador, en las muestras de polipos en las 4 muestras sólo se identificó en 2 muestras de no fumadores, en las muestras de los sujetos con sinusitis crónica se expresó en 6 de 11 de las muestras de los sujetos, dos de ellas eran de no fumadores, dos no se sabe el estatus y dos fumadores y se expresó

en el único caso con alergia. Sugieren en este estudio la posible participación de este receptor con el transporte de calcio, así como la adhesión y motilidad celular, también relacionada con factores de tipo neuroendrina regulando la respuesta de tipo glandular y vascular, es posible que la sobreexpresión de estos factores en la mucosa respiratoria y en este caso en epitelio nasal genere hiperpolarización con el aumento intracelular de calcio y a su vez una respuesta inflamatoria crónica³⁹.

Lo que pudiera llevarnos a explicar la posible participación del receptor de acetilcolina nAChRs $\alpha 4$ en la poliposis nasal como parte de los mecanismos que lleven a su fisiopatología y aún más al identificar su relación con la exposición a humo de tabaco, por lo que sugerimos se efectúen a futuro estudios que puedan estudiar más a fondo su mecanismo de acción en la inflamación de los pólipos nasales.

CONCLUSION

En este estudio se encontró en las muestras de pacientes con poliposis nasal expresión de receptores de acetilcolina nAChRs $\alpha 4$.

En los pacientes expuestos a humo de tabaco el porcentaje de expresión de los receptores de acetilcolina nAChRs $\alpha 4$ fue mayor que en los no expuestos.

Es indispensable buscar los posibles mecanismos de acción de los receptores de acetilcolina nAChRs $\alpha 4$ en el proceso inflamatorio de los pólipos y la intervención del humo de tabaco en su expresión.

REFERENCIAS

- 1) Cassale MP, Massimiliano P, Emanuela V. Nasal Polyposis: From Pathogenesis to Treatment, An Update. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2011;10; 158-163.
- 2) Grzanka A, Misiólek M. Molecular mechanisms of glucocorticoids action: implications For treatment of rhinosinusitis and nasal polyposis, *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2011;268:247–253.
- 3) Larsen K, Tos M. The estimated incidence of symptomatic nasal polyps. *Acta Otolaryngol* 2002;122:179–182.
- 4) Dufour X, Bedier A, Ferrie J. Diffuse Nasal Polyposis and Endonasal Endoscopic Surgery: Long-Term Results, a 65-Case Study. *Laryngoscope* 2004;11;1982-1987.
- 5) Mitroi M, Capitanesc A, Mogoanta C. Expression pattern of CK7 and CK20 in nasal Polyps, at patients with chronic rhinosinusitis With nasal polyposis, *Rom J Morphol Embryol* 2011;52(3 Suppl):1051–1057.
- 6) Settipane GA. Epidemiology of nasal polyps. *Allergy Asthma Proc* 1996;17:231–236.
- 7) Fokkens W, Lund V, Mullol J. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps. *Rhinol Suppl* 2007:1-136.
- 8) Alexiou A, Panayota S. Nasal Polyps: Heredity, Allergies, and Environmental and Occupational Exposure. *J Otolaryngol-Head Neck Surg* 2011; 40: 58-63.
- 9) Houser SM, Keen KJ. The role of allergy and smoking in chronic rhinosinusitis and polyposis. *Laryngoscope* 2008;118:1521–7.
- 10) Collins MM, Pnag YT, Loughran S, Wilson JA. Environmental risk factors and gender in nasal polyposis. *Clinical Otolaryngol Allied Sci* 2002, 27:314-17.

- 11) Houser SM, Keen KJ. The Role of Allergy and Smoking in Chronic Rhinosinusitis and Polyposis. *Laryngoscope* 2008;118:1521-27.
- 12) Kyung WH, Tae YK, Seong KP, Ga BP, Dae YH, Woo YB. Nasal polyp chitinolytic activity associated with smoking or allergy. *International Forum of Allergy Rhinology* 2014;4:2.
- 13) Wilson KF, McMains C, Orlandi RR. The association between allergy and chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps: an evidence-based review with recommendations. *International Forum of Allergy & Rhinology* 2014;4:2.
- 14) Ferguson BJ, Rubinstein E. In reference to The role of allergy and smoking in chronic rhinosinusitis and polyposis. *Laryngoscope* 2009;119:7.
- 15) Keiger, Jane C, Jones M., Kim R, et al. Nicotinic cholinergic receptor expression in the human nasal mucosa *Ann. Otol. Rhinol Laryngol* 2003;112:77.
- 16) Catassi A, Servent D, Paleari L, Cesario A, Russo P. Multiple roles of nicotine on cell proliferation and inhibition of apoptosis: implications on lung carcinogenesis. *Mutation Research* 2008;659:221-231.
- 17) Egleton R., Brown K., Dasgupta P. Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis. *Trends in Pharmacological Sciences* 2008;29:151-158.
- 18) Carlisle D, Liu X, Hopkins T, Swick M, Dhir R, Siegfried. Nicotine activates cell-signaling pathways through muscle-type and neuronal nicotinic acetylcholine receptors in non-small cell lung cancer cells. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2007;20:629–641.
- 19) Arredondo J, Chernyavsky A, Marubio L, Beaudet A, Jolkovsky D, Pinkerton K. et al. Receptor-Mediated Tobacco Toxicity. Regulation of Gene Expression through $\alpha 3\beta 2$ Nicotinic Receptor in Oral Epithelial Cells. *Am J Pathol* 2005;166: 597-613.

- 20) West K, Brognard J, Clark A, Linnoila I, Yang X, Swain S, et al. Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. *J Clin Invest* 2003; 111: 81-90.
- 21) Carslie D, Kaprio J, Poussa T, Nieminen MM. Prevalence of asthma, aspirin intolerance, nasal polyposis and chronic obstructive pulmonary disease in a population-based study. *Int J Epidemiol* 2003;28:717–722.
- 22) Amos C, Wu X, Broderick P, Gorlov I, Gu J, Eisen T, et al. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nature Genetics* 2008;40; 5: 616-622.
- 23) Hierneke C, Stolp M, Reuss S, Wevers A, Reinhardt S, Maelicke A, et al. Expression of alpha subunit genes of nicotinic acetylcholine receptors in human lymphocytes. *Neurosci Lett* 1996 ; 214; 2-3 :171-174
- 24) Plummer III H, Dhar M, Schuller H. Expression of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in human lung cells. *Respir Res* 2005;6:29.
- 25) Davis R, Rizwani W, Banerjee S, Kovacs M, Haura E, Coppola D, et al. Nicotine Promotes Tumor Growth and Metastasis in Mouse Models of Lung Cancer. *PLoS One* 2009; 4; 10: e7524 1-8.
- 26) Pries R, Wollenberg B. Cytokines in head and neck cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17:141–146.
- 27) Zheng Y, Ritzenthaler J, Roman J, Han S. Nicotine Stimulates Human Lung Cancer Cell Growth by Inducing Fibronectin Expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37:681-690.
- 28) Trombino S, Bisio A, Catassi A, Cesario A, Falugi C, Russo P. Role of the non-neuronal human cholinergic system in lung cancer and mesothelioma: possibility of new therapeutic strategies. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2004;4:535-42.

- 29) Paleari L, Negri E, Catassi A, Cilli M, Servent D, D'Angelillo R, et al. Inhibition of Nonneuronal $\alpha 7$ -Nicotinic Receptor for Lung Cancer Treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:1141-1150.
- 30) Sheppard B, Williams M, Plummer III H, Schuller H. Activation of voltage-operated Ca^{2+} channels in human small cell lung carcinoma by the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Int J Oncol* 2000;16:513-518.
- 31) Jull B, Plummer III H, Schuller H. Nicotinic receptor-mediated activation by the tobacco-specific nitrosamine NNK of a Raf-1/MAP kinase pathway, resulting in phosphorylation of c-myc in human small cell lung carcinoma cells and pulmonary neuroendocrine cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:707-717.
- 32) Polak J, Van Noorden S. *Immunocytochemistry: Modern Methods and Applications*. Radcliffe England Ed. WRIGHT, 2nd Ed. 1986. Van Noorden S Chapter 3. Tissue Preparation and Immunostaining Techniques for Light Microscopy.
- 33) IHCWORLD Life Science Information Network. 2007 http://www.ihcworld.com/_intro/intro.htm (Consultada 17/03/2010).
- 34) Angel G: Interpretación clínica del laboratorio Santafé de Bogotá Ed. Panamericana 2000. Angel G: Inmunofluorescencia.
- 35) Gary H, Kaser M: *Making and Using Antibodies. A practical handbook*. Boca Raton FL EUA. Ed. CRC Press 2007. Ramos Vara J, Ackerman J: *Immunohistochemical Methods*.
- 36) Burnette W. "Western Blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* 1981, 112 (2): 195-203.

- 37) Conyemr R, Medina M, Sepulveda J, De la Fuente R, Kumate J. La Encuesta Nacional de Adicciones de México. *Salud Publica Mex* 1990;32:507-522.
- 38) Kramer MF, Ostertag P, Pfrogner E, Rasp G. Nasal interleukin-5, immunoglobulin E, eosinophilic cationic protein, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in chronic sinusitis, allergic rhinitis, and nasal polyposis. *Laryn* 2000 ; 110 : 1056-1062).
- 39) Wessler I. Non neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression function in humans. *Pharmacolther* 1998; 77:59-79.
- 40) Bernstein JM. The molecular biology of nasal polyposis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2001 ; 1 : 262-267
- 41) Kule ZG, Habesoglu TE, Somay A, Deveci HS, Kule M, Gursel AO, Histopathological characteristics of nasal polyps in smokers and non-smokers. *J Craniofac Surg*. 2014 May;25(3):946-
- 42) Chu CJ, Yang YC, Wei JX, Zhang L. Association of nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha-4 polymorphisms with smoking behaviors in Chinese male smokers; *Chin Med J (Engl)*. 2011 Jun;124(11):1634.
- 43) Hiernke C, Stolp M, Reuss S, Wevers A, Reinhardt S, Maelicke A, et al. Expression of alpha subunit genes of nicotinic acetylcholine receptors in human lymphocytes. *Neurosci Lett* 1996 ; 214; 2-3 :171-174

ANEXOS

ANEXO 1

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL UMAE CENTRO MEDICO LA RAZA

Hoja de recolección número:

Folio Patología:

Hospital:

Instrumento de medición

Favor de completar de acuerdo a la información señalada en el expediente clínico

1.- Nombre: _____

2.- Número de afiliación: _____ 3.- Edad: _____

Peso y talla _____ IMC _____

4.- Sexo _____

5.- Teléfono: _____

6.- Dirección _____

5. Tiempo de evolución de poliposis nasal _____

7.- Clasificación (Lund Mckay) _____

8.- Grado de obstrucción (Lateralidad y porcentaje) FND: FNI:

9. Antecedentes señalados en historia clínica en el expediente (marcar con una cruz):

Tabaquismo SI___ NO___ Alcoholismo SI___ NO___

10.- Pruebas cutáneas Fecha Resultado

11.- Exposición a contaminantes del medio ambiente laboral SI NO CUAL

Hoja de recolección patología número:

Folio Patología:

Hospital

12.- Código asignado a laminillas de esta muestra:

13.- Porcentaje de células positivas que expresan receptores en la muestra:

Receptor nAChRs $\alpha 4$

ANEXO 2

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACION EN PROYECTOS DE INVESTIGACION CLINICA PARA ADULTOS. HOSPITAL CENTRO MEDICO "LA RAZA".

Lugar y fecha_____.

Por medio de la presente acepto participar, nombre:_____ en el proyecto de investigación titulado “EXPRESIÓN PROTEICA DE LAS SUBUNIDADES DE LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA nAChRs α 4 EN PACIENTES CON POLIPOSIS NASAL Y SU ASOCIACIÓN CON LA EXPOSICIÓN AL HUMO DE TABACO” que tiene como objetivo identificar Identificar en pacientes con diagnóstico de poliposis nasal la cantidad expresión proteica de las subunidades de receptores muscarinico de acetilcolina nAChRs α 4 y su asociación con la exposición a humo de tabaco, con registro ante el Comité Local de Investigación con el número _____. El estudio consistirá de la aplicación de un cuestionario para evaluar la de exposición de factores ambientales y la obtención de una muestra de los pólipos de su nariz de 3x3 mm que se extraen como parte del tratamiento quirúrgico de su enfermedad.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en la aplicación de un cuestionario para evaluar las características de la exposición de factores ambientales y la obtención de una muestra de los pólipos de su nariz que se extraen como parte del tratamiento quirúrgico de su enfermedad.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de la participación en éste estudio, aún así, estaré pendiente y en contacto con el investigador Dra. B. Montaña V. (57245900 ext. 23446) ante la presencia de cualquier molestia.

El investigador principal se ha comprometido a darme la información oportuna sobre cualquier procedimiento, para responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda

que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo del Instituto.

El investigador principal me ha dado seguridad de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones de este estudio y que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque ésta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

_____ No autorizo que se tome la muestra

_____ Si autorizo que se tome la muestra sólo para este estudio.

_____ Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros.

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4to piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores, México, D.F., C.P. 06720. Teléfono 55 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comisión.etica@imss.gob.mx.

**Nombre y firma
del paciente**

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

**Testigo
Nombre, dirección, relación y firma.**

**Testigo
Nombre, dirección, relación y firma.**

ANEXO 3

ENCUESTA TABAQUISMO CUESTIONARIO SOBRE CONSUMO DE TABACO.

Nombre: _____ Fecha: _____

Ocupación: _____

Instrucciones. Para cada pregunta del cuestionario selecciona la respuesta a y marque la opción correspondiente, rellene completamente con un círculo su respuesta.

1. ¿Alguna vez has probado cigarros, aunque sólo hayas aspirado una o dos veces?

- A) Si
- B) No

2. ¿Cuántos años tenías cuando probaste fumar por primera vez?

- A) Nunca he fumado cigarros
- B) 10 años o menos
- C) 11 años de edad
- D) 12 años de edad
- E) 13 años de edad
- F) 14 años de edad
- G) 15 años de edad
- H) 16 años o más

SI TU RESPUESTA ES "NUNCA HE FUMADO CIGARROS" FAVOR DE PASAR A LA PREGUNTA NUMERO 11.

3. Cuando fumaste por primera vez ¿cuál fue la razón por que lo hiciste?

- A) Por curiosidad
- B) Por que me presionaron mis amigos
- C) Para sentirme parte de un grupo
- D) Para parecer de más edad
- E) Para tener más personalidad
- F) Porque ya tengo edad suficiente para hacerlo
- G) Otra

4. Durante los pasados 30 días (un mes), ¿cuántos días fumaste cigarros?

- A) 0 días
- B) 1 a 2 días
- C) 3 a 5 días
- D) 6 a 9 días
- F) 20 a 29 días
- G) cada día los 30 días

5. Durante los pasados 30 días (un mes), los días en que fumaste, ¿cuántos cigarros fumaste?

- A) No fumé cigarros durante los pasados 30 días (un mes).
- B) Menos de un cigarro por día
- C) 1 cigarro por día
- D) 2 a 5 cigarros por día
- E) 6 a 10 cigarros por día
- F) 11 a 20 cigarros por día
- G) Más de 20 cigarros por día

6. Durante los pasados 30 días (un mes), ¿qué marca de cigarros fumaste con mayor frecuencia?

(SELECCIONAR UNA SOLA RESPUESTA)

- A) No fumé cigarros durante los pasados 30 días (un mes)
- B) Ninguna marca especial
- C) Marlboro
- D) Broadway
- E) Boots
- F) Montana
- G) Camel
- H) Otra marca nacional, ¿cuál? _____

7. Durante los pasados 30 días (un mes), ¿alguna vez utilizaste tabaco en otra forma que no fueran cigarros? (por ejemplo: tabaco para masticar, aspirar, puros, pipa, cigarros pequeños, chicles de nicotina)

- A) Sí
- B) No

8. ¿Cuál es el lugar donde principalmente fumas? (marca una sola respuesta)

- A) No fumo cigarros
- B) En casa
- C) En el colegio/ escuela
- D) En el trabajo
- E) En casa de amigos
- F) En fiestas y reuniones sociales
- G) En lugares públicos (por ejemplo: parques, en la calle, en centros comerciales, etc)
- H) En otros lugares

9. ¿Alguna vez fumas ó tienes ganas de fumar inmediatamente cuando te levantas en la mañana?

- A) Nunca fumé cigarro
- B) He dejado el cigarro
- C) No, no fumo ni me dan ganas de fumar inmediatamente al levantarme en la mañana
- D) Sí, algunas veces fumo o me dan ganas de fumar al levantarme en la mañana
- E) Sí, siempre fumo o tengo ganas de fumar al levantarme en la mañana

10. En los pasados 2 días ¿fumaste cigarros?

- A) No fumé cigarros durante los pasados 2 días (ayer o anteayer).
- B) Menos de un cigarro por día
- C) 1 cigarro por día
- D) 2 a 5 cigarros por día
- E) 6 a 10 cigarros por día
- F) 11 a 20 cigarros por día
- G) Más de 20 cigarros por día

11. Durante los pasados 7 días ¿cuántos días fumó alguien en tu presencia estando en tu casa?

- A) 0 días
- B) 1 a 2 días
- C) 3 a 4 días
- D) 5 a 6 días
- E) 7 días

12. Durante los pasados 2 días ¿fumó alguien en tu presencia estando en tu casa?

- A) SI
- B) NO

13. Durante los pasados 7 días ¿cuántos días fumó alguien en tu presencia estando fuera de tu casa?

- A) 0 días
- B) 1 a 2 días
- C) 3 a 4 días
- D) 5 a 6 días
- E) 7 días

14. Durante los pasados 2 días ¿fumó alguien en tu presencia estando fuera de tu casa?

- A) SI
- B) NO

15. ¿Alguno de tus mejores amigos o amigas fuma?

- A) Ninguno de ellos
- B) Alguno de ellos
- C) La mayoría de ellos
- D) Todos ellos