



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA GRADUACIÓN OPORTUNA**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA
UMAE HOSPITAL GENERAL DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA
SERVICIO OTORRINOLARINGOLOGIA Y CIRUGIA DE CABEZA Y CUELLO**

Título

EXPRESIÓN DE RECEPTORES NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA ALFA 4 Y ALFA 7
EN PACIENTES CON CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO, CON
ANTECEDENTE DE EXPOSICIÓN A HUMO DE TABACO Y SU RELACIÓN CON EL
DESENLACE CLÍNICO

T E S I S

**MODALIDAD DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y
CUELLO**

PRESENTA:

Dr. Juan Carlos Benavides Méndez

TUTOR:

Dra. Bertha Beatriz Montaña Velázquez

Ciudad de México, Agosto 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ÍNDICE.

Portada.....	1
Índice.....	2
Título.....	3
Resumen.....	6
Marco teórico.....	9
Pregunta de investigación.....	22
Objetivo.....	23
Material y métodos.....	24
Descripción general del estudio.....	25
Procedimientos.....	26
Procesamiento de datos.....	28
Resultados.....	29
Tablas.....	30
Discusión.....	31
Conclusión.....	34
Anexos.....	35
Bibliografía.....	57

TÍTULO

EXPRESIÓN DE RECEPTORES NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA ALFA 4 Y
ALFA 7 EN PACIENTES CON CARCINOMA DE CABEZA Y CUELLO, CON
ANTECEDENTE DE EXPOSICIÓN A HUMO DE TABACO Y SU RELACIÓN CON
EL DESENLACE CLÍNICO

ALUMNO: Dr. Juan Carlos Benavides Méndez

Médico Residente de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello

juanbenavidesm@gmail.com, Teléfono: +521 55 6696 1739

IVESTIGADOR RESPONSABLE: Dra. B. Beatriz Montaña Velázquez

Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello, UMAE CMN “La
Raza”, IMSS, Matricula 10934855

Beamont_2000@yahoo.com.mx, Teléfono: +521 55 5408 4752

Colaboradores:

Dr. Silvio Jurado Hernández

Jefe del Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello, UMAE
CMN “La Raza”

silviojurado@yahoo.com.mx, Telefono: +521 55 5437 1477

Dra. María del Rosario Mora Campos

Jefe del servicio del departamento de anatomía patológica CMN “La Raza”

Dr_morac@hotmail.com.mx, Teléfono: +521 55 4855 5451.

Dra. Magdalena Sánchez Uribe

Departamento de Anatomía Patológica, UMAE CMN “La Raza”

magdasaum@hotmail.com, Teléfono: +521 55 2671 0720

Dr. Francisco García Vázquez (PARTICIPACION INTELECTUAL)

Departamento de Anatomía Patológica, Instituto Nacional de Pediatría,

momoxco@yahoo.com, Teléfono: +521 55 5418 1690

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



AUTORIZADA POR:

**DRA. MARIA TERSA RAMOS CERVANTES
DIRECTORA DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN EN SALUD**

**DRA. LUZ ARCELIA CAMPOS NAVARRO
PROFESORA TITULAR DEL CURSO DE OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y
CUELLO CMN LA RAZA**

**DRA. B. BEATRIZ MONTAÑO VELÁQUEZ
MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE OTORRINOLARINGOLOGIA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y
CUELLO CMN LA RAZA**

**DR. SILVIO JURADO HERNÁNDEZ
JEFE DEL SERVICIO DE OTORRINOLARINGOLOGIA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO CMN LA
RAZA**

**DRA. JUAN CARLOS BENAVIDES MENDEZ
RESIDENTE DE CUARTO AÑO DE OTORRINOLARINGOLOGIA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO
CMN LA RAZA**

RESUMEN

EXPRESIÓN DE RECEPTORES NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA ALFA 4 Y ALFA 7 EN PACIENTES CON CARCINOMA DE CABEZA Y CUELLO, CON ANTECEDENTE DE EXPOSICIÓN A HUMO DE TABACO Y SU RELACIÓN CON EL DESENLACE CLÍNICO

Antecedentes: El carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) comprende un grupo de tumores con importante morbilidad y mortalidad, con aproximadamente 500.000 nuevos casos alrededor del mundo. La nicotina es uno de los principales productos de la combustión del humo de tabaco. La nicotina se une a receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs). Estos receptores constituyen una familia heterogénea de canales de iones, identificados inicialmente en el tejido neuronal. Sin embargo, se han identificado en tejidos no neuronales, como en la vía aérea alta (epitelio nasal: nAChRs $\alpha 3$, $\alpha 7$ y $\beta 2$) y baja (epitelio bronquial: nAChRs $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ y $\beta 2$, $\beta 4$) y en tumores relacionados a la exposición al humo de tabaco en vía aérea como el cáncer de pulmón de células escamosas (en líneas celulares y tejido tumoral: nAChRs $\alpha 3-5$, $\alpha 7$ y $\beta 2$). La presencia de estos receptores se ha relacionado con la regulación de la cascada de segundos mensajeros, en la proliferación celular, migración, angiogénesis, apoptosis, metástasis y resistencia a la quimioterapia, con la participación de la nicotina.

Objetivo: En pacientes con diagnóstico de cáncer de epidermoide de cabeza y cuello, identificar la expresión proteica de las subunidades de nAChRs alfa 4 y alfa 7 con antecedente de exposición al humo de tabaco y su relación con el desenlace clínico.

Material y Métodos: Previa autorización de Comité Institucional de Investigación, se realizó un estudio clínico, transversal, ambilectivo, comparativo. Participaron 40 pacientes con diagnóstico de cáncer de cabeza y cuello excepto cáncer de laringe, programados para cirugía o postoperados para el tratamiento de su enfermedad, mayores de 18 años de edad, previamente identificados de los registros de cirugías del servicio de Cirugía de Cabeza y Cuello del CMN La Raza y de las libretas de

programación, que acudieron a las citas de seguimiento para control postoperatorio, en los que se requirió entrevistar directamente, para medir las variables demográficas y clínicas de interés y de quienes se solicitó la autorización para la obtención de una de las muestras de tejido tumoral de cualquier localización que se obtengan o se hayan obtenido durante la cirugía programada por su médico tratante, con fines de diagnóstico o tratamiento y que se encuentran en los archivos de los servicios de Patología del Hospital de la Raza. Se identificaron dos grupos de pacientes, expuestos y no expuestos al humo de tabaco: a) 27 pacientes con exposición a humo de tabaco, con edades de 35 a 89 años, promedio de edad de 64,2 años y desviación estándar de 14,35, de los cuales 20 correspondieron al sexo masculino y 7 al sexo femenino. De los cuales sus diagnósticos principales fueron: tumores epidermoides de cavidad oral 5 pacientes, siendo el subsitio más frecuente la lengua con 4 casos y tan solo un caso para piso de la boca, en orofaringe se encontraron 11 casos, siendo el subsitio más frecuente la amígdala con 8 casos, seguidos por base de lengua, paladar blando y faringe con un caso cada uno, dentro de otros sitios en cabeza y cuello fueron la nariz y senos paranasales los lugares principalmente afectados con 9 casos, seguido por nasofaringe e hipofaringe con un caso respectivamente, en este estudio no encontramos carcinoma epidermoide de glándulas salivales. b) 13 pacientes sin exposición a humo de tabaco, con edades comprendidas entre los 51 a 82 años de edad, promedio de edad de 69.4 años y desviación estándar de 10.1, de los cuales 6 corresponden al sexo masculino y 7 al sexo femenino. Los diagnósticos principales fueron: tumores epidermoides de cavidad oral 4 pacientes, siendo los subsitios más frecuentes la lengua y el paladar duro con 2 casos cada uno, en orofaringe se encontraron 2 casos, siendo la amígdala el único subsitio afectado con 2 casos, dentro de otros sitios en cabeza y cuello fueron la nariz y senos paranasales los lugares afectados con 6 casos. Ninguno recibió tratamiento con inmunoterapia, esteroides, radioterapia o quimioterapia. Se eliminaron 6 casos por muestra inadecuada u otros tumores diferentes a los epidermoides. En las muestras archivadas de tejido de cáncer de cabeza y cuello (excepto laringe) se efectuó la detección proteica de las subunidades $\alpha 4$, y $\alpha 7$ de los nAChRs mediante inmunohistoquímica enzimática.

Las muestras se procesaron en el servicio de patología del Centro Médico Nacional “La Raza”, la identificación e interpretación, y fueron evaluadas por dos observadores de manera cegada e independiente previamente estandarizados. Se tuvo el apoyo de los patólogos del CMNR para la obtención de información complementaria. Se recolectó la información y se procesó para su análisis estadístico.

Resultados:

De los 40 pacientes estudiados se identificaron 27 expuestos a humo de tabaco y 13 no expuestos. Los pacientes con cáncer epidermoide de cabeza y cuello, se presentaron con mayor frecuencia en cavidad oral de estos la amígdala, seguido de los senos paranasales y por último cavidad oral con la lengua, con una mayor prevalencia en el grupo de expuestos a humo de tabaco.

Los pacientes expuestos a humo de tabaco presentaron un desenlace de mortalidad y de recaídas con mayor frecuencia que aquellos sin antecedente de exposición a humo de tabaco.

Con respecto a la expresión del receptor nicotínico de acetilcolina alpha 7 se encontró con una mayor frecuencia de expresión en los pacientes expuestos a humo de tabaco comparado con los no fumadores (X^2 , $p < 0.05$).

En relación a la expresión del receptor nicotínico de acetilcolina alpha 4 se encontró una mayor frecuencia de expresión en los fumadores comparada con los no fumadores (X^2 , $p < 0.05$).

Conclusión:

En este estudio se identificó una mayor frecuencia de expresión de los receptores alfa 4 y alfa 7 en pacientes con cáncer epidermoide cabeza y cuello, principalmente en los expuestos al humo de tabaco. En los expuestos a humo de tabaco en este grupo de pacientes con cáncer epidermoide de cabeza y cuello presentaron un peor desenlace clínico, con mayor frecuencia de recaídas.

MARCO TEORICO

El carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) comprende un grupo de tumores con importante morbilidad y mortalidad, con aproximadamente 500.000 nuevos casos alrededor del mundo (1).

Los hombres se ven afectados significativamente más que las mujeres con una relación que oscila entre 2:1 a 4:1. La tasa de incidencia en los hombres es superior a 20 por cada 100.000 habitantes en las regiones de Francia, Hong Kong, el subcontinente indio, Europa central y oriental, España, Italia, Brasil y entre los afroamericanos en los Estados Unidos.

El cáncer de boca y lengua es más común en el subcontinente indio; el cáncer nasofaríngeo es más común en Hong Kong; y los cánceres faríngeos y/o laríngeos son más comunes en otras poblaciones; estos factores contribuyen de manera desproporcionada a la carga global de cáncer en estos países asiáticos (2), (3).

En los Estados Unidos, el cáncer de cabeza y cuello corresponde a un 3 % de los tumores malignos, con aproximadamente 62.000 casos anualmente y de los cuales 13.000 van a morir por la enfermedad (13). En Europa, existen aproximadamente 250.000 casos (alrededor del 4 % de la incidencia del cáncer) y se registraron 63.500 muertes en 2012 (4).

Los tumores malignos ubicados en la cabeza y el cuello representan el 17.6% de la totalidad (108,064) de las neoplasias malignas reportadas al Registro Histopatológico de las Neoplasias en México (RHNM) en el año 2002 (5). Las neoplasias malignas de las vías Aero-digestivas superiores, representan el 12% de las lesiones malignas en cabeza y cuello, con 2269 casos. Los sitios específicos se distribuyen de la siguiente forma: cáncer laríngeo, 42%; cáncer bucal, 37%; cáncer de fosas nasales y senos paranasales, 9%; cáncer de la bucofaringe, 6%; cáncer de la nasofaringe, 3%, y el cáncer de hipofaringe también con un 3%. En el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI (H. O. CMN SXXI) se ha reportado una prevalencia similar a la reportada en la literatura mundial de un 27%

de todos los tumores de células escamosas de cabeza y cuello, de éstos, de un 85 a 95% de los tumores epiteliales, corresponden a carcinoma de células escamosas (6).

Con relación a la mortalidad, las cifras absolutas son relativamente bajas, sin embargo, son muy importantes por la alta letalidad entre los afectados y por las graves secuelas estéticas y funcionales derivadas del tratamiento.

La letalidad estimada para el cáncer escamoso de cabeza y cuello es la siguiente: cavidad bucal 62.4%, laringe: 93%, bucofaringe cerca del 100%, hipofaringe 94%, nasofaringe 83% y, fosas nasales y senos paranasales 47%. Aun considerando los sesgos, sorprende la letalidad del cáncer de laringe, mientras que las cifras asociadas al cáncer de hipofaringe es baja; esto nos hace suponer que una buena proporción de casos de cáncer de hipofaringe son diagnosticados como cánceres laríngeos y contribuyen, de manera ficticia, a una alta letalidad por cáncer laríngeo, de acuerdo con el RHNM (5).

Los factores de riesgo más frecuentemente asociados con el cáncer de cabeza y cuello incluyen el tabaquismo, el consumo de alcohol, la presencia de virus del papiloma humano (VPH) (especialmente para los cánceres de la orofaringe), y la infección por el virus de Epstein-Barr (EBV) (para los cánceres nasofaríngeos en Asia) (7).

Infección por virus: se ha asociado la infección por el virus del papiloma humano (VPH) y el desarrollo del cáncer de cabeza y cuello. La asociación entre la presencia de DNA de alto riesgo (tipos 16 y 18) en las células tumorales ha demostrado ser mayor aunado a la prevalencia de anticuerpos específicos del VPH en tejido tumoral, lo que traduce una evidencia epidemiológica e inmunológica del virus como un fuerte factor de riesgo, aún después del control del uso de tabaco y alcohol. El mecanismo molecular del efecto oncogénico del virus sugiere un rol clave para la activación epigenética de p53, pRb o ambas y la alteración del ciclo celular controlado por esos genes. (8)

El cáncer en la nasofaringe no parece estar asociado al tabaco y al alcohol. En este sitio, el virus de Epstein-Barr (EBV) es detectado consistentemente en los carcinomas de regiones con alta y baja prevalencia, lo que sugiere que la infección y sus efectos son un importante factor epidemiológico (34). Fenómeno semejante ocurre con relación a las fosas nasales y senos paranasales, donde se señala que la exposición a ciertos metales, como el aluminio, el níquel y el cromo; exposición a cloro fenoles y fibras orgánicas, propios de las industrias mobiliarias, textil y peletera, podrían tener un papel importante en la génesis de estos tumores (9).

La exposición ocupacional e inhalaciones tóxicas: en la exposición a ciertas sustancias del medio ambiente laboral, se ha observado un riesgo elevado para el desarrollo de cáncer de cabeza y cuello, con la exposición a sílice, veta de madera, polvo de cuero e hidrocarburos, así como asbesto, gas mostaza y productos de la combustión de diésel. (10)

Radiación previa en el cuello: aunque la radiación ionizante es una modalidad terapéutica curativa bien establecida, se conoce que la radiación también es carcinogénica en hueso y tejidos blandos, además debido al número creciente de pacientes que sobreviven más años por el tratamiento, se ha recomendado mantener vigilancia por los clínicos para excluir tumores nuevos por la radiación, por la posibilidad de un segundo tumor de células escamosas metácrono, años después de la radiación. (10)

El consumo de alcohol es otro de los factores más importantes asociado al cáncer en seres humanos, después del tabaquismo, las infecciones crónicas y posiblemente la obesidad (30). Con excepción de las aflatoxinas (11), ningún factor dietético se asocia a tan fuerte evidencia de carcinogenicidad. En Europa Central y Europa Occidental, la carga de cáncer y otras enfermedades asociadas al alcohol es substancial. El consumo de alcohol aumenta rápidamente en muchos lugares del mundo, como el este de Asia. A pesar de la importancia en la carcinogénesis humana, la investigación del alcohol y cáncer permanece limitada en aspectos clínicos, epidemiológicos y experimentales. (11) El consumo de alcohol aumenta de forma independiente el riesgo de cáncer en el tracto digestivo superior, aunque a

menudo es difícil separar los efectos del consumo de tabaco y alcohol (12, 13,14). El riesgo relativo de desarrollar cáncer de cabeza y cuello debido al alcohol parece ser dependiente de la dosis (14, 15,16). Como ejemplo, un estudio informó un aumento del riesgo de cinco a seis veces para cáncer de cabeza y cuello con la ingesta de alcohol mayor que 50 g / día en comparación con menos de 10 g / día (una bebida contiene aproximadamente 12 g de alcohol) (14). El consumo de alcohol y el tabaquismo parecen tener un efecto interactivo y multiplicativo sobre el riesgo de desarrollar cáncer de cabeza y cuello (17, 18, 19,20).

Un fumador que no bebe incrementa su riesgo en relación directa a la cantidad de tabaco que fuma. Un bebedor que no fuma incrementa su riesgo con relación a la cantidad de bebidas alcohólicas que ingiere; en cambio, beber y fumar tiene un efecto multiplicador más que aditivo. Así, un fumador de dos paquetes al día y que bebe dos a cuatro bebidas tiene un riesgo 35 veces mayor que los controles (21). Herity (22) reportó asociación entre la cantidad de alcohol consumido y el riesgo para cáncer de lengua. Varias teorías de los mecanismos de esta relación invocan los efectos solventes del alcohol en las membranas mucosas, los efectos negativos en los procesos hepáticos de detoxificación y las deficiencias nutricionales comunes en los alcohólicos (23).

El tabaquismo es el factor de riesgo importante para el desarrollo de cáncer de cabeza y cuello (24).

En los fumadores de cigarrillos, hay un riesgo mayor de 5 a 25 veces para padecer cáncer en comparación con los no fumadores (17,24). Parece que hay una relación dosis-respuesta como se ilustra por las siguientes observaciones:

Un estudio de casos y controles comparó 605 pacientes con cáncer de cabeza y cuello con 756 controles (15). El riesgo relativo (RR) de los consumidores de tabaco fue de 6,5. El RR aumentó con la duración del tabaquismo y poco a poco se redujo después de dejar de fumar sin ningún exceso de riesgo luego de los 20 años.

En otro estudio de casos y controles, los pacientes que fumaban más de un paquete de cigarrillos por día tenían un aumento de 13 veces en el riesgo de desarrollar

cáncer de cabeza y cuello (18). La edad de inicio de fumar (por debajo de 18 años de edad) y la duración del tabaquismo (más de 35 años de edad) fueron factores de alto riesgo. La cesación de fumar se asoció con una disminución significativa en el RR.

La primera y más importante causa de cáncer escamoso de cabeza y cuello es el hábito tabáquico. Se estima que entre 85 y 90% de los casos con cáncer de las vías aerodigestivas superiores son explicados por la exposición al tabaco y el riesgo es proporcional a la intensidad de la exposición; así los fumadores intensos tienen un riesgo superior respecto a los fumadores ocasionales.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, el consumo de tabaco se ha incrementado, se estima que el número de fumadores a nivel mundial es de 2 mil millones y que ocurren más de 5 millones de muertes cada año en el mundo por enfermedades relacionadas a la exposición al humo de tabaco entre ellas el cáncer y la tendencia para el año 2030, será de 8 millones de muertes cada año (25). En México, la Encuesta Nacional de Adicciones en el año 2008, mostró que en la población de 12 a 65 años, el 18.5% correspondió a fumadores activos (14 millones de mexicanos) los cuales iniciaron el hábito de fumar a una edad promedio de 13.7 años; el 35.6% de la población (27 millones de mexicanos) había probado alguna vez en su vida el cigarrillo (26). Recientemente se ha registrado un importante incremento en la frecuencia de tabaquismo, principalmente entre los individuos jóvenes. De acuerdo al Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI), entre los adolescentes (12-17 años) se ha observado un incremento en los patrones de consumo, no obstante a que a esta edad es ilegal el uso de tabaco; además, reconoce que su consumo se hace cada vez a edades más tempranas. (27).

La exposición pasiva al humo de cigarrillo puede ser un factor contribuyente. En un informe se evaluaron 59 pacientes con cáncer de cabeza y cuello que no fumaban y no abusan del alcohol (20). Estos pacientes tenían un riesgo significativamente mayor por la exposición al humo de tabaco ambiental, tanto en el lugar de trabajo y en el hogar, que la población control sin cáncer. Esta relación se produjo

principalmente en mujeres y las personas con cáncer de lengua; Entre las personas que reportan nunca haber fumado y con exposición a tabaquismo involuntario como un factor importante para el desarrollo de cáncer del tracto aerodigestivo superior (OR, 1.60; 95% IC 1.04-2.46, aunque no se compara con los fumadores actuales en donde se ha asociado a un OR, 6.72; 95% IC, 5.45-8.30 en general y con un OR, 12.19; 95% IC, 8.29-17.92 para cáncer de hipofaringe y laringe) (28).

La evidencia sobre la asociación del consumo de marihuana y el desarrollo de cáncer de cabeza y cuello es algo contradictorio (21,29,). La presentación de informes y el sesgo de selección, así como la confusión por el uso del alcohol y el tabaco limitan la capacidad de los estudios observacionales para excluir o confirmar esta relación.

Para llevar a cabo el diagnóstico, se realiza una historia clínica que permita la sospecha de cáncer de cabeza y cuello, se realiza examen físico completo de la región de la cabeza y el cuello, rinoscopia, otoscopia, laringoscopia, exploración de cuello (detectando masas palpables). Una vez identificada la lesión tumoral, se realiza biopsia para establecer el diagnóstico de malignidad, la misma que debe evaluarse según su accesibilidad tomarse en consultorio o en la sala de operaciones, bajo anestesia general. El diagnóstico de extensión tumoral se lleva a cabo mediante tomografía computada de cuello o resonancia magnética además de realizar radiografía de tórax para evaluar metástasis a pulmón o la presencia de un segundo tumor primario.

Uno de los principales productos de la combustión del humo de tabaco es la nicotina. La nicotina es un alcaloide natural derivado de la hoja del tabaco nicotina tabacum, la cual ejerce acciones complejas tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. Es una amina terciaria compuesta por un anillo piridínico y otro anillo de pirrolidina (30). La nicotina se destila del tabaco ardiente y es transportada a los pulmones en las partículas de humo. La absorción de nicotina por el tracto respiratorio, mucosa bucal y piel, depende del pH y se ve favorecida en gran parte gracias a su alta solubilidad en lípidos (31), se metaboliza en el hígado en un 80 a 90% y el resto en pulmón y riñones (31,32).

La nicotina del humo del tabaco se ha visto implicada en la inhibición de la apoptosis, así como también interfiere con la muerte celular inducida por una variedad de agentes que dañan el ADN, afectando a la eficacia de la terapia del cáncer de cabeza y cuello. (33)

La nicotina ejerce estos efectos por el desplazamiento de la acetilcolina (ACh), de los receptores neuronales nicotínicos de la acetilcolina nicotínicos (nAChR). (34) La nicotina, es un componente principal de humo de cigarrillo, se ha demostrado estar implicada en la iniciación, promoción, e incluso la progresión de varios tumores, incluyendo el cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, y diferentes tipos de cáncer de cabeza y cuello. (6,7) Sin embargo, el efecto de la nicotina sobre la tumorigénesis y la angiogénesis de diferentes tipos de cáncer de cabeza y cuello y el mecanismo de acción de la nicotina involucrados siguen siendo en gran medida desconocidos.

La nicotina contribuye al cáncer principalmente por la promoción del crecimiento y la supervivencia de clones de células mutadas y las protege de la apoptosis inducida por la quimio y radioterapia (37). Específicamente en los carcinomas de cabeza y cuello (45). De este modo, la nicotina implementa un "segundo golpe" que promueve la supervivencia y expansión de las células con daño genómico inducida por carcinógenos "profesionales" (un efecto exigentico (38)). Por otro lado, la inactivación de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) puede atenuar la proliferación celular inducida por la nicotina o nitrosaminas del tabaco [39-40], y suprimir la quimiorresistencia nicotinoddependiente [41]. Por lo tanto, los nAChR son vistos como un objetivo de drogas novedoso para la prevención y tratamiento de diversas formas de cáncer. (37)

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) (42). Los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) constituyen una familia heterogénea de canales de iones que regulan la transmisión sináptica en neuronas, se dividen en los subtipos nicotínicos (nAChRs) y muscarínicos (mAChRs). Los nAChRs son pentámeros de subunidades homólogas

o heterólogas de nAChRs dependientes a la unión de ligandos como acetilcolina, nicotina y NNK (43,44). Una vez que estos receptores se unen a sus ligandos, sufren cambios en su conformación, que afecta a todas las subunidades y conlleva a la apertura de un canal conductor de iones (calcio – Ca²⁺) a lo largo de la membrana plasmática. Aunque los nAChRs fueron originalmente encontrados en el tejido neural, recientemente se han reportado presentes en tipos de células no excitables (46-47), los que podrían contribuir al desarrollo de la morbilidad asociada con el tabaco. Los nAChRs se subdividen en neuronales y musculares, los cuales también pueden estar presentes en tejidos no neuronales o no musculares. Los nAChRs neuronales están compuestos de diferentes subunidades que incluyen de la $\alpha 1$ a la $\alpha 10$ y de la $\beta 1$ a la $\beta 4$. Los nAChRs musculares además de las subunidades anteriores, también están compuestos por $\alpha 1$, $\beta 1$, δ , ϵ y γ (48). Los nAChRs neuronales que existen como homopentámeros están compuestos de subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ o $\alpha 9$ y los heteropentámeros comprometen varias combinaciones de subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 6$ con $\beta 2$ - $\beta 4$. Todas las subunidades de nAChRs se están dispuestas simétricamente alrededor de un eje perpendicular, delineando así un poro iónico central, comparten una estructura homóloga con un dominio largo extracelular, cuatro regiones transmembrana (M1-M4) estructurada en hélices α , un dominio largo citoplasmático entre M3 y M4 y finalmente una cola corta extracelular C-terminal (46,47). Los genes que codifican las subunidades individuales de los nAChRs se denominan para la subunidad α como CHRNA1 a CHRNA10 (48).

La vía de señalización de la fosfatidilinositol- 3- kinasa (PI3K) es crucial en numerosos aspectos celulares involucrados en el crecimiento y la supervivencia celular. La vía de la PI3K es estimulada fisiológicamente como consecuencia de la activación de receptores de membrana tirosina kinasa. La PI3K activa, fosforila el fosfatidil inositol 3,4 difosfato (PIP2) convirtiéndolo en el segundo mensajero fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), el cual, corriente abajo, conduce a la activación de la proteína Akt. La Akt tiene múltiples blancos, responsables de los efectos de la activación de la vía. La activación anormal de esta vía conduce a una respuesta proliferativa y antiapoptótica que se relaciona con el desarrollo de múltiples tipos de cáncer; por esto, su estudio es parte crucial para el entendimiento

de los procesos de carcinogénesis. La activación de Akt nicotínico depende de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-K) y nAChR específicos. La activación nicotínica de la vía de la PI3-K / Akt podría contribuir a la biología de otros tipos de tumores relacionados con el tabaco como los de cabeza y cuello. La alteración de la vía de señalización PI3-K / Akt es una de las más frecuentemente afectadas en cáncer escamoso de cabeza y cuello (49).

Los nAChRs se han encontrado en el sistema nervioso central y en tejidos no neuronales, tales como $\alpha 3$, $\alpha 5$, y $\alpha 7$ en el epitelio bronquial (50,51), $\alpha 4$ en células epiteliales alveolares (52) y $\alpha 7$ en células neuroendocrinas pulmonares y líneas celulares humanas de cáncer de pulmón (53), queratinocitos de la piel (54), tejidos vasculares (55) y linfocitos humanos (56).

En células no neuronales del epitelio de la vía aérea se han identificado los nAChRs $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 10$, $\beta 2$ y $\beta 4$, predominantemente $\alpha 3$, $\alpha 7$ y $\beta 2$ en la mucosa nasal en un 92, 88 y 75% respectivamente y en el epitelio bronquial principalmente $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ y $\beta 2$, $\beta 4$ (57, 58).

En las células epiteliales bronquiales se expresan estos nAChRs como parte de una vía colinérgica autocrina en la cual todas las proteínas necesarias para la señalización colinérgica están presentes. Se ha demostrado que la interacción de acetilcolina (ACh) con los receptores nicotínicos estimula la proliferación celular (50). La expresión de la vía colinérgica, está presente en el cáncer de pulmón de células escamosas, dado por mayores cambios en la síntesis y degradación de ACh y la sobreexpresión de nAChRs. Dada la regulación al alta de señalizaciones colinérgicas en cáncer de pulmón, el rol del tabaquismo y estimulación constante de las células de cáncer por nicotina es de obvia importancia (59).

El tabaquismo está relacionado con cambios en oncogenes o genes supresores de tumores, sin embargo, la activación de las vías de transducción de señales que promueven la supervivencia celular también podría contribuir al desarrollo de tumores relacionados con el tabaco. La vía de la PI3-K / Akt contribuye a la

tumorigénesis y a la resistencia a la terapia y ha sido identificada como una de las vías alteradas con más frecuencia en tumores escamosos de cabeza y cuello. (60)

La presencia de las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 7$ de los receptores nAChRs se han relacionado con la regulación de la cascada de segundos mensajeros, proliferación, migración, angiogénesis y apoptosis en líneas celulares tumorales de pulmón, en modelos animales de cáncer de pulmón y muestras de tumores de cáncer de pulmón humanos con la participación de la nicotina y que también pueda ser un motivo para el desarrollo de metástasis y resistencia a la quimioterapia ante la continua exposición a nicotina (61,62).

Receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 4$

Localización, función y participación en el desarrollo de cáncer:

Tejido linfóide: en linfocitos T humanos y en células B. Actúan en la proliferación celular, diferenciación y procesos de selección en células T y en células B, estimulan crecimiento y disminuyen la producción de anticuerpos (63).

Pulmón: células epiteliales alveolares, células neuroepiteliales (53).

Otros sitios: músculo liso vascular, astrocitos (el subtipo $\alpha 4\text{-}\beta 2$ es el más común del sistema nervioso central), mucosa nasal de cornete inferior, líneas celulares semejantes a músculo esquelético.

Receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$

Localización, función y participación en el desarrollo de cáncer:

Uno de los receptores más estudiados es el nAChR $\alpha 7$ relacionado a la participación en el cáncer de pulmón (64,65), 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 (59, 62), tiene agonistas selectivos como la metilconitina y la $\alpha\text{-Bgtx}$, que atenúan los efectos proliferativos de la nicotina.

Tejido linfoide: en linfocitos T humanos, células epiteliales de timo, células B, macrófagos humanos (56).

Piel: en queratinocitos humanos (54)

Pulmón: células epiteliales bronquiales, células neuroendocrinas, líneas celulares y tejido tumoral de cáncer de pulmón de células no pequeñas y pequeñas (55).

Otros sitios: líneas celulares semejantes a músculo esquelético, cuerpos neuroepiteliales, células endoteliales y células de músculo liso vascular, endotelio cerebral, ganglios autonómicos, en mucosa nasal de cornete inferior. Estudios anteriores han demostrado que las funciones de la nicotina a través de su interacción con $\alpha 7$ AChR (66, 67). El $\alpha 7$ AChR es un tipo de proteína de membrana integral, que está altamente expresada en una porción de tumores y está estrechamente asociada con el crecimiento de células cancerosas, la migración, la angiogénesis y la apoptosis (68).

La interacción de éste receptor con la nicotina y NNK en estudios en líneas celulares y tejidos de cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas, se han vinculado con diversos mecanismos para el desarrollo de cáncer: Se ha demostrado que induce angiogénesis mediante la liberación de adrenalina que regula la expresión de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (62).

Se ha demostrado que por la vía de la liberación de ACh se regula al alta la Prostaglandina E2 (PGE2), una citocina inmunosupresora asociada a la falta de respuestas a reacciones de inmunidad tardía (que evita el reconocimiento inmunogénico de células tumorales) vía receptor $\alpha 7$ en el cáncer de pulmón (69).

El tabaquismo está relacionado con cambios en oncogenes o genes supresores de tumores, sin embargo, la activación de las vías de transducción de señales que promueven la supervivencia celular también podría contribuir al desarrollo de tumores relacionados con el tabaco. La vía de la PI3-K / Akt contribuye a la tumorigénesis y la resistencia a la terapia contra el cáncer y recientemente, ha sido identificada como una de las vías alteradas con más frecuencia en tumores

epidermoides de cabeza y cuello (70). Muchos informes han apuntado a esta vía como el mediador de los efectos anti-apoptóticas tras la activación de los nAChR (71,76).

Cabe mencionar que la proliferación de las células tumorales de pulmón inducida por la nicotina se bloquea por la unión de la α -Bgtx con nAChR α 7 y se vislumbra su posible alcance terapéutico (72).

Los nAChRs están implicados en el reforzamiento del consumo de muchas drogas de abuso, incluyendo el etanol, se ha postulado que el consumo de alcohol se puede ver incrementado por el consumo de nicotina, al mismo tiempo muchas sustancias que ayudan al abandono de tabaco son efectivas para el retiro del abuso de alcohol (73). Se ha sugerido para este papel la expresión de receptores α 4 que da una mayor sensibilidad a la nicotina y al alcohol, manifiestos por su asociación en reflejos como el de sobresalto acústico en pacientes con alto consumo de alcohol (74). Otro receptor involucrado en este fenómeno es el α 7 que se ha detectado en pacientes con consumo paralelo de alcohol y tabaco (75).

Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que la interacción de la nicotina con los nAChRs en el cáncer. Sin embargo, existen escasos estudios de la expresión de los nAChRs con respecto a la exposición en cáncer de cabeza y cuello.

Un estudio ha demostrado que en las células epiteliales de las vías respiratorias humanas el Akt se activa tras la exposición a corto plazo con la nicotina, y de esta forma antagoniza la apoptosis. Este efecto se ha sugerido como contribuyente a la aparición de carcinogénesis relacionadas con el tabaco. Además, la activación de Akt se encontró en diez muestras de cáncer de pulmón humano en fumadores, pero no se evaluó la expresión de las subunidades de nAChR en esas muestras (77). Por lo tanto, la vinculación de acumulación pAkt a la activación de nAChR en muestras de cáncer de pulmón humano es indirecta, ya que se basa en las observaciones obtenidas a partir de células cultivadas o de modelos de ratón. De hecho, los mecanismos moleculares de la exposición a la nicotina a largo plazo en el desarrollo de cáncer no son claras. Los datos por Chu et al. (78) han revelado que la nicotina

potencia el proceso de carcinogénesis de pulmón, principalmente por la regulación de la actividad de Ras. Sin embargo, demostraron que PI3-K, se activó de forma transitoria y este efecto sólo se detectó después de 1 h de exposición a la nicotina, disminuyendo después de períodos de exposición más largos. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que las vías bioquímicas distintas de la vía de la PI3-K / Akt podría ser responsable de los efectos adversos de la nicotina sobre el desarrollo de cáncer de cabeza y cuello. Por otra parte, las diferencias en los enfoques técnicos (Western blot frente a la detección inmunohistoquímica de pAkt) podría explicar, al menos en parte, por los diferentes resultados, en un estudio en el cual se buscó la presencia de receptores nicotínicos en carcinoma escamoso de cabeza y cuello se encontró que de 30 pacientes los receptores se expresaron de la siguiente manera: $\alpha 3$ 1/30, $\alpha 5$ 15/30, $\alpha 7$ 10/30. (79)

A nivel mundial se ha incrementado el número de muertes por enfermedades relacionadas al tabaco como el cáncer. Existen estudios que señalan la posible contribución del tabaco y/o sus componentes como la nicotina en el cáncer de pulmón, a través de la participación de receptores nicotínicos de acetilcolina. Los cánceres de cabeza y cuello son enfermedades también asociadas a la exposición a tabaco, sin embargo, existe escasa información que señale la presencia de estos receptores en dichos tumores. En este estudio se pretende identificar la expresión de las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 7$ de los nAChRs mediante IHQ de tipo enzimático en bloques de tejido tumoral de los pacientes con diagnóstico de cáncer de cabeza y cuello y la diferencia en su expresión relacionada al antecedente de tabaquismo en los pacientes y permitir futuros estudios que señalen su participación en esta enfermedad, realizar medidas de prevención o la posibilidad de ser un blanco terapéutico.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

En los pacientes con cáncer de cabeza y cuello:

- ¿Cuál es la expresión proteica de las subunidades de nAChRs $\alpha 4$ y $\alpha 7$ detectada mediante inmunohistoquímica enzimática en las muestras de tejido tumoral de pacientes con antecedente de exposición al humo de tabaco y su relación al desenlace clínico?

OBJETIVO

En los pacientes con cáncer de cabeza y cuello:

- Identificar la expresión proteica de las subunidades de nAChRs $\alpha 4$ y $\alpha 7$ detectada mediante inmunohistoquímica enzimática en las muestras de tejido tumoral de pacientes antecedente de exposición al humo de tabaco y su relación al desenlace clínico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio clínico, transversal, ambilectivo, comparativo. Participaron 36 pacientes con diagnóstico de cáncer de cabeza y cuello excepto cáncer de laringe, programados para cirugía o postoperados para el tratamiento de su enfermedad, mayores de 18 años de edad, previamente identificados de los registros de cirugías del servicio de Cirugía de Cabeza y Cuello del CMN La Raza y de las libretas de programación, que acudieron a las citas de seguimiento para control postoperatorio, en los que se pudo entrevistar directamente, para medir las variables demográficas y clínicas de interés y de quienes se solicitó la autorización para la obtención de una de las muestras de tejido tumoral de cualquier localización que se obtengan o se hayan obtenido durante la cirugía programada por su médico tratante, con fines de diagnóstico o tratamiento y que se encuentran en los archivos de los servicios de Patología del Hospital de la Raza.

Se identificaron dos grupos expuestos y no expuestos a humo de tabaco (ver Tabla 1):

a) 27 pacientes con exposición a humo de tabaco, con edades de 35 a 89 años, promedio de edad de 64,2 años y desviación estándar de 14,35, de los cuales 20 correspondieron al sexo masculino y 7 al sexo femenino. De los cuales sus diagnósticos principales fueron: tumores epidermoides de cavidad oral 5 pacientes, siendo el subsitio más frecuente la lengua con 4 casos y tan solo un caso para piso de la boca, en orofaringe se encontraron 11 casos, siendo el subsitio más frecuente la amígdala con 8 casos, seguidos por base de lengua, paladar blando y faringe con un caso cada uno, dentro de otros sitios en cabeza y cuello fueron la nariz y senos paranasales los lugares principalmente afectados con 9 casos, seguido por nasofaringe e hipofaringe con un caso respectivamente, en este estudio no encontramos carcinoma epidermoide de glándulas salivales.

b) 13 pacientes sin exposición a humo de tabaco, con edades comprendidas entre los 51 a 82 años de edad, de los cuales 5 corresponden al sexo masculino y 7 al sexo femenino. Los diagnósticos principales fueron: tumores epidermoides de

cavidad oral 4 pacientes, siendo los subsitios más frecuentes la lengua y el paladar duro con 2 casos cada uno, en orofaringe se encontraron 2 casos, siendo la amígdala el único subsitio afectado con 2 casos, dentro de otros sitios en cabeza y cuello fueron la nariz y senos paranasales los lugares afectados con 6 casos.

Ninguno recibió tratamiento con inmunoterapia, esteroides, radioterapia o quimioterapia.

Se eliminaron 6 por muestra inadecuada u otros tumores diferentes a los epidermoides.

Descripción General del Estudio.

Luego de la autorización del protocolo por el Comité Local Institucional, se captaron 40 pacientes de manera consecutiva y que cumplieron con los criterios de selección, con diagnóstico de cáncer de cabeza y cuello de cualquier etapa TNM y localización (excepto laringe y tiroides) que acudieron a la consulta de cabeza y cuello del CMN La Raza, a todos se les interrogó sobre sus antecedentes generales, previo consentimiento informado, asegurando la confidencialidad, para identificar y recopilar la información sobre el grado de exposición y patrón de consumo de tabaco prequirúrgico, así como también se interrogaron las variables demográficas (edad, sexo) y clínicas de interés (localización, tiempo de evolución, etapa TNM, antecedentes de reflujo faringolaríngeo, infección por el virus del papiloma humano, exposición a contaminantes del medio ambiente laboral, consumo de alcohol) al paciente con cáncer de cabeza y cuello y en su caso se consultó en el expediente. Lo mismo se realizó en aquellos pacientes que se lograron entrevistar y que tenían laminillas y que formaron parte de los estudios llevados a cabo con autorización por parte de la misma unidad, y que también se les solicitó para este estudio. Una vez identificados los pacientes que cumplían con los criterios de selección, se buscaron en los servicios de patología del CMN La Raza, las muestras archivadas de tejido de cáncer de cabeza y cuello (excepto laringe) para efectuar la detección proteica de las subunidades $\alpha 4$, y $\alpha 7$ de los nAChRs mediante inmunohistoquímica enzimática. Los pacientes en quienes no fue posible obtener la muestras archivadas

del servicio de patología pero aptos mediante entrevista para el estudio, fueron eliminados del mismo.

Las muestras se procesaron en el servicio de patología del Centro Médico Nacional “La Raza”, la identificación e interpretación, y fueron evaluadas por dos observadores de manera cegada e independiente previamente estandarizados. Se tuvo el apoyo de los patólogos del CMNR para la obtención de información complementaria. Se recolectó la información y se procesó para su análisis estadístico.

PROCEDIMIENTOS

Se aplicó a todos los pacientes que hayan cumplido los criterios de selección, previa estandarización la identificación proteica de las subunidades $\alpha 4$ y 7 mediante IHQ enzimática. Habiendo identificado mediante registros de cirugías del servicio de Cabeza y cuello y anatomía patológica del Hospital CMN La Raza, las laminillas de los bloques de parafina con tejido tumoral de cabeza y cuello que además, de acuerdo al Médico Patólogo para cortar para las laminillas que tuvieran el 80% de tejido tumoral, de acuerdo a las características microscópicas del tejido, las cuales se procesaron con IHQ enzimática. La determinación de la expresión proteica de las subunidades $\alpha 4$ y 7 de los nAChRs se realizó a través del procesamiento habitual de tejidos embebidos en parafina en cortes de tejido de 4 micrómetros e inmediatamente se fijaron en metanol para realizar la IHQ asignando un número de identificación a cada espécimen de tejido, la diluciones de cada reactivo también pasaron por un proceso de estandarización a fin de encontrar la reacción que permita la comparación contra el control positivo.

Procedimiento de Inmunohistoquímica:

Para la tinción de hematoxilina / eosina (H&E) e inmunohistoquímica (IHQ), las piezas quirúrgicas fueron fijadas en Formaldehído al 3.7 - 4.0 % amortiguado con buffer de fosfatos e incluidas en medio para tejido compuesto de parafina purificada y polímeros plásticos con pesos moleculares regulados, punto de fusión de 56° C

enriquecida con DMSO. Se realizaron cortes a 2 micrómetros, los cuales fueron utilizados para la interpretación histopatológica con H&E así como para la inmunotinción empleando el sistema de detección de proteínas libre de Biotina EPOS/HRP por sus siglas en inglés (Enhanced Polymer One Step/ Horseradish Peroxidase), para el desenmascaramiento de epítopes se utilizó Target Retrieval Solution high pH cat. Target Retrieval Solution, High pH (n.º de catálogo K8000/K8004/K8010/K8014) (Dako Corporation, Carpintería Calif. USA), para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena las muestras fueron tratadas con peróxido de Hidrógeno al 0.9% en medio acuoso por 5 minutos, posteriormente la muestra se incubó por 45 minutos con los anticuerpos monoclonales anti alfa 4 y anti alfa 7. La muestra fue incubada con el anticuerpo secundario y se incubó con el Sistema de Detección MACH1 por 30 min, para visualizar la reacción se utilizó como sustrato 3,3'-deaminobencidina-H₂O₂, misma que fue monitoreada al microscopio, los cortes se contrastaron con Hematoxilina Lillie-Mayer's (estos 3 últimos reactivos de Biocare Medical), finalmente se les colocó un cubreobjetos de vidrio y resina. (Modificación de García Vázquez F J. 2005)

Las muestras teñidas fueron fotografiadas en un microscopio de campo claro (LEICA DM750 y DM500) con el objetivo de 40X con gradilla cuadrada en 3 campos calibrados al azar. Se expresó el tipo de subunidad positiva previa estandarización y sin conocer si las muestras pertenecen al grupo de expuestos o no expuestos al humo de tabaco. Se midió la concordancia, intra- e interobservador con cálculo de kappa, de las mediciones efectuadas por 2 observadores independientes y cegados al tipo de exposición. Se calculó el número de células positivas.

Procesamiento de Datos

Los resultados de las encuestas y de cada una de las determinaciones se registró en la hoja de recolección de datos, y luego en una hoja de cálculo (Excel 2000) para efectuar su análisis estadístico (CSS, Statsof, Tulsa). El responsable de concentrar y resguardar la información fue el alumno del posgrado y los mecanismos para garantizar la confidencialidad de estos.

Aspectos Estadísticos.

El análisis estadístico se realizó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov para identificar la distribución de los datos y estadística analítica con la prueba de Z para proporciones, χ^2 (ji cuadrada) o Exacta de Fisher.

Para evaluar la asociación de las variables de interés, análisis de regresión lineal múltiple, significativa cuando $p < 0.05$. La concordancia intra- e interobservador con cálculo de kappa para la evaluación por anatomopatólogos de la IHQ.

RESULTADOS

De los 40 pacientes estudiados se identificaron 27 expuestos a humo de tabaco y 13 no expuestos, de los cuales en la Tabla 1 se identifican sus principales características.

Los pacientes con cáncer epidermoide de cabeza y cuello, se presentaron con mayor frecuencia en cavidad oral de estos la amígdala, seguido de los senos paranasales y por último cavidad oral con la lengua, con una mayor prevalencia en el grupo de expuestos a humo de tabaco (Ver Tabla 2)-

Los pacientes expuestos a humo de tabaco presentaron un desenlace de mortalidad y de recaídas con mayor frecuencia que aquellos sin antecedente de exposición a humo de tabaco (Tabla 3).

Con respecto a la expresión del receptor nicotínico de acetilcolina alpha 7 se encontró con una mayor frecuencia de expresión en los pacientes expuestos a humo de tabaco comparado con los no fumadores (X^2 , $p < 0.05$) (Tabla 4).

En relación a la expresión del receptor nicotínico de acetilcolina alpha 4 se encontró una mayor frecuencia de expresión en los fumadores comparada con los no fumadores (X^2 , $p < 0.05$) (Tabla 4).

TABLAS

Tabla 1. Características de los 40 pacientes, expuestos y no expuestos al humo de tabaco.

	Exposición a humo De tabaco (n=27)	No exposición a Humo de tabaco (n=13)
Características de los pacientes	<i>n (D.E)</i>	<i>n (D.E)</i>
Edad (años)	64,2 (14.3)	69,4 (10.1)
Masculino	20 (74.07%)	6 (46.15%)
Femenino	7 (25.92%)	7 (58.33%)
Tipo de exposición		
Activo	10 (37,03%)	N/A
Pasivo	1 (3.70%)	N/A
Exfumador	16 (59,25%)	N/A
No fumador	N/A	13 (100%)
Grado de diferenciación		
Bien Diferenciado	4 (14.81%)	5 (38,4%)
Moderadamente Diferenciado	17 (62,96%)	6 (46.1%)
Poco Diferenciado	5 (18,51%)	2 (15,3%)
Exposición Alcohol	22 (81,48%)	7 (53,8%)
Exposición Ambiente adverso	5 (18,51%)	6 (46,1%)
Cuello positivo	12 (44,44%)	1 (7,6%)
Comorbilidades	12 (44,44%)	5 (38,4%)
HAS		
DM	9 (33,33%)	4 (30,7%)
ASMA	1 (3,7%)	0 (0%)
EPOC	3 (11,11%)	1 (7,6%)
INDICE TABAQUICO	7,49	0
Promedio		
ESTADIO	2 (7,40%)	1 (7,6%)
I	13 (48,14%)	5 (38,4%)
II	9 (33,33%)	7 (53,8%)
III	3 (11,11%)	0 (0%)
IV		
Total	27 (100%)	13 (100%)

Tabla 2. Tipos de tumores epidermoides de cabeza y cuello y su frecuencia de acuerdo a la exposición a humo de tabaco.

Grupos	Exposición a humo De tabaco (n=27)	No exposición a Humo de tabaco (n=13)
Cáncer Cavidad Oral	5 (18,51%)	4 (30,7%)
Lengua	4 (14,81%)	2 (15,3%)
Paladar Duro	0 (0%)	2 (13,3%)
Piso de la boca	1 (3,7%)	0 (0%)
Encía	0 (0%)	0 (0%)
Cáncer Orofaringe	11 (40,74%)	2 (15,3%)
Amígdala	8 (29,62%)	2 (15,3%)
Base de Lengua	1 (3,70%)	0 (0%)
Paladar Blando	1 (3,70%)	0 (0%)
Faringe	1 (3,70%)	0 (0%)
Otra Ubicación	11 (40,74%)	7 (53,8%)
Nariz y SPN	9 (33,33%)	7 (53,8%)
Nasofaringe	1 (3,70%)	0 (0%)
Hipofaringe	1 (3,70%)	0 (0%)
Glandula Salival	0 (3,70%)	0 (0%)
Total	27 (100%)	13 (100%)

Tabla 3. Desenlace clínico de acuerdo a la exposición a humo de tabaco.

Grupos	Vivo	Muerto	Recaída	Libre de Enfermedad
Expuestos	16 (59,2%)	11 (40,7%)	5 (18,51%)	8 (29,62%)
No Expuestos	11 (84,61%)	2 (15,3%)	1 (15,38%)	11 (84,6%)

Tabla 4. Expresión de receptores nicotínicos en los expuestos y no expuestos a humo de tabaco.

Grupos	Exposición a humo De tabaco (n=27)	No exposición a Humo de tabaco (n=13)
Expresión Receptor Alfa 4	(77,7%)	(69,2%)
Expresión Receptor Alfa 7	(40,7%)	(69,2%)

DISCUSIÓN.

El objetivo de este estudio fue Identificar la expresión proteica de las subunidades de nAChRs $\alpha 4$ y $\alpha 7$ detectada mediante inmunohistoquímica enzimática en las muestras de tejido tumoral de cáncer epidermoide de pacientes con cáncer de cabeza y cuello con antecedente de exposición al humo de tabaco y su relación al desenlace clínico.

La nicotina que anteriormente se le atribuía solo su capacidad adictiva, hoy en día se conoce que esta sustancia es capaz de reorganizar proteínas celulares y producir efectos biológicos patológicos en células no neuronales como las epiteliales de cabeza y cuello (95,96), también se asocia a la capacidad de producir mayor supervivencia a células cancerígenas incluyendo las de cabeza y cuello (97,98), La unión de la nicotina con la membrana celular modula la expresión de diversos genes categorizados en 4 grupos: factores de transcripción, factores de transformación de proteínas, RNA unido a proteínas y el citoplasma asociado a proteínas. (99)

El nAChR alfa 7 también se expresa en distintos tipos de cáncer del ser humano y su activación acelera la progresión de tumores, lo que indica que la señalización de nAChR alfa 7 puede jugar un papel importante en el desarrollo de los cánceres relacionados con el tabaco. (100, 101)

Es bien conocido que el humo de tabaco tiene una fuerte asociación al desarrollo de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, en nuestro estudio encontramos que dicho cáncer es más frecuente en personas que estuvieron expuestas al humo de tabaco con un total de 27 pacientes, de estos es el cáncer de cavidad oral el que se presenta con mayor frecuencia siendo el subsitio amígdala la zona más afectada.

El receptor nicotínico alfa 4 se expresó con mayor frecuencia en personas expuestas al humo de tabaco y por tanto en personas que presentaron un peor desenlace clínico, con mayor tasa de mortalidad, recaída y poca respuesta al tratamiento, todo ello debido a la probable inhibición de la apoptosis celular como lo reporta la literatura.

CONCLUSION

En este estudio se identificó una mayor frecuencia de expresión de los receptores alfa 4 y alfa 7 en pacientes con cáncer epidermoide cabeza y cuello, principalmente en los expuestos al humo de tabaco. En los expuestos a humo de tabaco en este grupo de pacientes con cáncer epidermoide de cabeza y cuello presentaron un peor desenlace clínico, con mayor frecuencia de recaídas.

ANEXOS

ANEXO 1



Table 1

**American Joint Committee on Cancer (AJCC)
TNM Staging Classification for the Lip and Oral Cavity
(7th ed., 2010)**

(Nonepithelial tumors such as those of lymphoid tissue, soft tissue, bone, and cartilage are not included)

Primary Tumor (T)

TX	Primary tumor cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumor
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor 2 cm or less in greatest dimension
T2	Tumor more than 2 cm but not more than 4 cm in greatest dimension
T3	Tumor more than 4 cm in greatest dimension
T4a	Moderately advanced local disease* (lip) Tumor invades through cortical bone, inferior alveolar nerve, floor of mouth, or skin of face, that is, chin or nose (oral cavity) Tumor invades adjacent structures (eg, through cortical bone [mandible or maxilla] into deep [extrinsic] muscle of tongue [genioglossus, hyoglossus, palatoglossus, and styloglossus], maxillary sinus, skin of face)
T4b	Very advanced local disease Tumor invades masticator space, pterygoid plates, or skull base and/or encases internal carotid artery

*Note: Superficial erosion alone of bone/tooth socket by gingival primary is not sufficient to classify a tumor as T4.

Regional Lymph Nodes (N)

NX	Regional lymph nodes cannot be assessed
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Metastasis in a single ipsilateral lymph node, 3 cm or less in greatest dimension
N2	Metastasis in a single ipsilateral lymph node, more than 3 cm but not more than 6 cm in greatest dimension; or in multiple ipsilateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension; or in bilateral or contralateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension
N2a	Metastasis in single ipsilateral lymph node more than 3 cm but not more than 6 cm in greatest dimension
N2b	Metastasis in multiple ipsilateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension
N2c	Metastasis in bilateral or contralateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension
N3	Metastasis in a lymph node more than 6 cm in greatest dimension

Distant Metastasis (M)

M0	No distant metastasis
M1	Distant metastasis

Histologic Grade (G)

GX	Grade cannot be assessed
G1	Well differentiated
G2	Moderately differentiated
G3	Poorly differentiated
G4	Undifferentiated

[Continued...](#)

Table 1 — Continued

**American Joint Committee on Cancer (AJCC)
TNM Staging Classification for the Lip and Oral Cavity
(7th ed., 2010)**

(Nonepithelial tumors such as those of lymphoid tissue, soft tissue, bone, and cartilage are not included)

Anatomic Stage/Prognostic Groups

Stage 0	Tis	N0	M0
Stage I	T1	N0	M0
Stage II	T2	N0	M0
Stage III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Stage IVA	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
Stage IVB	Any T	N3	M0
	T4b	Any N	M0
Stage IVC	Any T	Any N	M1

TNM NASOFARINGE, OROFARINGE, HIPOFARINGE

Table 2 American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM Staging System for the Pharynx (7th ed., 2010) (Nonepithelial tumors such as those of lymphoid tissue, soft tissue, bone, and cartilage are not included)		Hypopharynx	
Primary Tumor (T)		T1	Tumor limited to one subsite of hypopharynx and/or 2 cm or less in greatest dimension
TX	Primary tumor cannot be assessed	T2	Tumor invades more than one subsite of hypopharynx or an adjacent site, or measures more than 2 cm but not more than 4 cm in greatest diameter without fixation of hemilarynx
T0	No evidence of primary tumor	T3	Tumor more than 4 cm in greatest dimension or with fixation of hemilarynx or extension to esophagus
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>	T4a	Moderately advanced local disease Tumor invades thyroid/cricoid cartilage, hyoid bone, thyroid gland, or central compartment soft tissue**
Nasopharynx		T4b	Very advanced local disease Tumor invades prevertebral fascia, encases carotid artery, or involves mediastinal structures
T1	Tumor confined to the nasopharynx, or tumor extends to oropharynx and/or nasal cavity without parapharyngeal extension*	**Note: Central compartment soft tissue includes prelaryngeal strap muscles and subcutaneous fat.	
T2	Tumor with parapharyngeal extension*		
T3	Tumor involves bony structures of skull base and/or paranasal sinuses		
T4	Tumor with intracranial extension and/or involvement of cranial nerves, hypopharynx, orbit, or with extension to the infratemporal fossa/masticator space		
*Note: Parapharyngeal extension denotes posterolateral infiltration of tumor.			
Oropharynx		Continued...	
T1	Tumor 2 cm or less in greatest dimension	Used with the permission of the American Joint Committee on Cancer (AJCC), Chicago, Illinois. The original and primary source for this information is the AJCC Cancer Staging Manual, Seventh Edition (2010) published by Springer Science+Business Media, LLC (SBM). (For complete information and data supporting the staging tables, visit www.springer.com .) Any citation or quotation of this material must be credited to the AJCC as its primary source. The inclusion of this information herein does not authorize any reuse or further distribution without the expressed, written permission of Springer SBM, on behalf of the AJCC.	
T2	Tumor more than 2 cm but not more than 4 cm in greatest dimension		
T3	Tumor more than 4 cm in greatest dimension or extension to lingual surface of epiglottis		
T4a	Moderately advanced local disease Tumor invades the larynx, extrinsic muscle of tongue, medial pterygoid, hard palate, or mandible*		
T4b	Very advanced local disease Tumor invades lateral pterygoid muscle, pterygoid plates, lateral nasopharynx, or skull base or encases carotid artery		
*Note: Mucosal extension to lingual surface of epiglottis from primary tumors of the base of the tongue and vallecula does not constitute invasion of larynx.			

Table 2 — Continued American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM Staging System for the Pharynx (7th ed., 2010) (Nonepithelial tumors such as those of lymphoid tissue, soft tissue, bone, and cartilage are not included)				Anatomic Stage/Prognostic Groups: Oropharynx, Hypopharynx			
Anatomic Stage/Prognostic Groups: Nasopharynx				Anatomic Stage/Prognostic Groups: Oropharynx, Hypopharynx			
Stage 0	Tis	N0	M0	Stage 0	Tis	N0	M0
Stage I	T1	N0	M0	Stage I	T1	N0	M0
Stage II	T1	N1	M0	Stage II	T2	N0	M0
	T2	N0	M0	Stage III	T3	N0	M0
Stage III	T2	N1	M0		T1	N1	M0
	T1	N2	M0	T2	N1	M0	
	T2	N2	M0	T3	N1	M0	
	T3	N0	M0	Stage IVA	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0		T4a	N1	M0
Stage IVA	T3	N2	M0	T1	N2	M0	
	T4	N0	M0	T2	N2	M0	
	T4	N1	M0	T3	N2	M0	
Stage IVB	T4	N2	M0	T4a	N2	M0	
	Any T	N3	M0	Stage IVB	T4b	Any N	M0
Stage IVC	Any T	Any N	M1	Any T	N3	M0	
				Stage IVC	Any T	Any N	M1
Histologic Grade (G)							
GX	Grade cannot be assessed						
G1	Well differentiated						
G2	Moderately differentiated						
G3	Poorly differentiated						
G4	Undifferentiated						

Etapificación TNM para cánceres de cavidad nasal y senos paranasales

Table 4	
American Joint Committee on Cancer (AJCC)	
TNM Staging System for the Nasal Cavity and Paranasal Sinuses	
(7th ed., 2010)	
(Nonepithelial tumors such as those of lymphoid tissue, soft tissue, bone, and cartilage are not included)	
Primary Tumor (T)	
TX	Primary tumor cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumor
Tis	Carcinoma in situ
Maxillary Sinus	
T1	Tumor limited to maxillary sinus mucosa with no erosion or destruction of bone
T2	Tumor causing bone erosion or destruction including extension into the hard palate and/or middle nasal meatus, except extension to posterior wall of maxillary sinus and pterygoid plates
T3	Tumor invades any of the following: bone of the posterior wall of maxillary sinus, subcutaneous tissues, floor or medial wall of orbit, pterygoid fossa, ethmoid sinuses
T4a	Moderately advanced local disease Tumor invades anterior orbital contents, skin of cheek, pterygoid plates, infratemporal fossa, cribriform plate, sphenoid or frontal sinuses
T4b	Very advanced local disease Tumor invades any of the following: orbital apex, dura, brain, middle cranial fossa, cranial nerves other than maxillary division of trigeminal nerve (V ₂), nasopharynx, or clivus
Nasal Cavity and Ethmoid Sinus	
T1	Tumor restricted to any one subsite, with or without bony invasion
T2	Tumor invading two subsites in a single region or extending to involve an adjacent region within the nasoethmoidal complex, with or without bony invasion
T3	Tumor extends to invade the medial wall or floor of the orbit, maxillary sinus, palate, or cribriform plate
T4a	Moderately advanced local disease Tumor invades any of the following: anterior orbital contents, skin of nose or cheek, minimal extension to anterior cranial fossa, pterygoid plates, sphenoid or frontal sinuses
T4b	Very advanced local disease Tumor invades any of the following: orbital apex, dura, brain, middle cranial fossa, cranial nerves other than (V ₂), nasopharynx, or clivus
Regional Lymph Nodes (N)	
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Metastasis in a single ipsilateral lymph node, 3 cm or less in greatest dimension
N2	Metastasis in a single ipsilateral lymph node, more than 3 cm but not more than 6 cm in greatest dimension; or in multiple ipsilateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension; or in bilateral or contralateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension
N2a	Metastasis in a single ipsilateral lymph node, more than 3 cm but not more than 6 cm in greatest dimension
N2b	Metastasis in multiple ipsilateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension
N2c	Metastasis in bilateral or contralateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension
N3	Metastasis in a lymph node, more than 6 cm in greatest dimension
Distant Metastasis (M)	
M0	No distant metastasis
M1	Distant metastasis

[Continued on next page](#)

Table 4 — Continued

American Joint Committee on Cancer (AJCC)

TNM Staging System for the Nasal Cavity and Paranasal Sinuses (7th ed., 2010)

(Nonepithelial tumors such as those of lymphoid tissue, soft tissue, bone, and cartilage are not included)

Anatomic Stage/Prognostic Groups				Histologic Grade (G)	
Stage 0	Tis	N0	M0	GX	Grade cannot be assessed
Stage I	T1	N0	M0	G1	Well differentiated
Stage II	T2	N0	M0	G2	Moderately differentiated
Stage III	T3	N0	M0	G3	Poorly differentiated
	T1	N1	M0	G4	Undifferentiated
	T2	N1	M0		
	T3	N1	M0		
Stage IVA	T4a	N0	M0		
	T4a	N1	M0		
	T1	N2	M0		
	T2	N2	M0		
	T3	N2	M0		
	T4a	N2	M0		
Stage IVB	T4b	Any N	M0		
	Any T	N3	M0		
Stage IVC	Any T	Any N	M1		

TNM GLANDULAS SALIVALES

Table 5			
American Joint Committee on Cancer (AJCC)			
TNM Staging System for the Major Salivary Glands (7th ed., 2010)			
(Parotid, Submandibular, and Sublingual)			
Primary Tumor (T)			
TX	Primary tumor cannot be assessed	N2a	Metastasis in a single ipsilateral lymph node, more than 3 cm but not more than 6 cm in greatest dimension
T0	No evidence of primary tumor	N2b	Metastasis in multiple ipsilateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension
T1	Tumor 2 cm or less in greatest dimension without extraparenchymal extension*	N2c	Metastasis in bilateral or contralateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension
T2	Tumor more than 2 cm but not more than 4 cm in greatest dimension without extraparenchymal extension*	N3	Metastasis in a lymph node, more than 6 cm in greatest dimension
T3	Tumor more than 4 cm and/or tumor having extraparenchymal extension*	Distant Metastasis (M)	
T4a	Moderately advanced disease	M0 No distant metastasis	
	Tumor invades skin, mandible, ear canal, and/or facial nerve	M1 Distant metastasis	
T4b	Very advanced disease	Anatomic Stage/Prognostic Groups	
	Tumor invades skull base and/or pterygoid plates and/or encases carotid artery	Stage I	T1 N0 M0
*Note: Extraparenchymal extension is clinical or macroscopic evidence of invasion of soft tissues. Microscopic evidence alone does not constitute extraparenchymal extension for classification purposes.		Stage II	T2 N0 M0
		Stage III	T3 N0 M0
			T1 N1 M0
			T2 N1 M0
			T3 N1 M0
		Stage IVA	T4a N0 M0
			T4a N1 M0
			T1 N2 M0
			T2 N2 M0
			T3 N2 M0
			T4a N2 M0
		Stage IVB	T4b Any N M0
			Any T N3 M0
		Stage IVC	Any T Any N M1
Regional Lymph Nodes (N)		Used with the permission of the American Joint Committee on Cancer (AJCC), Chicago, Illinois. The original and primary source for this information is the AJCC Cancer Staging Manual, Seventh Edition (2010) published by Springer Science+Business Media, LLC (SBM). (For complete information and data supporting the staging tables, visit www.springer.com .) Any citation or quotation of this material must be credited to the AJCC as its primary source. The inclusion of this information herein does not authorize any reuse or further distribution without the expressed, written permission of Springer SBM, on behalf of the AJCC.	
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed		
N0	No regional lymph node metastasis		
N1	Metastasis in a single ipsilateral lymph node, 3 cm or less in greatest dimension		
N2	Metastasis in a single ipsilateral lymph node, more than 3 cm but not more than 6 cm in greatest dimension; or in multiple ipsilateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension; or in bilateral or contralateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension		

ANEXO 2

Hoja de recolección número: _____

Folio Patología: _____

Código asignado laminillas: _____

Hospital: _____

Instrumento de medición

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

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

1.- Nombre: _____

2.- Número de afiliación: _____ 3.- Edad (años): _____

Peso (kg): _____ Talla (mts): _____ Fecha de Cirugía (dd/mm/aaaa): _____

Tipo de Cirugía: _____

4.- Sexo: _____ Teléfono: _____

5. Tiempo de evolución de cáncer de laringe _____

6.- Etapa (TNM) _____

Trabajo previo a la

7.- Localización del cáncer epidermoide de cabeza y cuello (subrayar):

Nariz y SPN

Faringe

Glándulas salivales

Cavidad Oral

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

Reflujo Faringolaríngeo: Si ___ No___

Papilomatosis Si ___ No___

Exposición a contaminantes del medio ambiente laboral: No___ Si___ [en caso de ser afirmativo:

subraye tipo(s)]:

Silice Veta de Madera Gases de Diesel Gas Mostaza Asbesto

Solventes Formaldehido Algodón Cuero

OTRO (Por favor especifique)

Tiempo de la exposición o exposiciones (años): _____

Ocupación:

Antecedente de radio o quimioterapia previo a cirugía (señalar):

___ No ___ Si

9.- Tipo de exposición al humo de tabaco (subrayar el inciso):

a) Expuesto

- Fumador activo (señale):

Tiempo de ser fumador activo:

Fumador leve

Fumador moderado

Fumador severo

- Fumador Pasivo
- Ambos (Fumador activo y pasivo)
- Ex fumador

b) Nunca Fumador

10.- Tipo de exposición al alcohol (subrayar el enciso).

a) Consuetudinario

b) Bebedor alto

c) No bebedor

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

Alfa 4: _____

Alfa 7: _____

ANEXO 3



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLITICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD**

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
(ADULTOS)**

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN
GUIÓN PARA SOLICITAR VERBALMENTE EL CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO:

Nombre del estudio:	EXPRESIÓN DE RECEPTORES NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA ALFA 4 Y ALFA 7 EN PACIENTES CON CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO, CON ANTECEDENTE DE EXPOSICIÓN A HUMO DE TABACO Y SU RELACIÓN CON EL DESENLACE CLÍNICO
Patrocinador externo (si aplica):	-
Lugar y fecha:	Ciudad de México, Agosto 2016. CMN La RAZA
Número de registro:	-
Justificación y objetivo del estudio:	Lo invitamos a participar en el protocolo de investigación expresión de receptores nicotínicos de acetilcolina alfa 4 y alfa 7 en pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello, con antecedente de exposición al humo de tabaco y su relación con el desenlace clínico. El estudio tiene como finalidad identificar y comparar la aparición de partículas en las células de cáncer de cabeza y cuello conocidas como receptores nicotínicos de acetilcolina que están posiblemente involucradas con el desarrollo del cáncer. Esta información se utilizará con fines de investigación.
Procedimientos:	En el caso de que usted desee participar de manera voluntaria, su participación en el estudio consistirá en dar respuesta a unos cuestionarios sobre consumo de tabaco y alcohol previo a la cirugía, así como algunos antecedentes posiblemente relacionados al cáncer de cabeza y cuello como son: reflujo faringolaríngeo, papilomatosis de cabeza y cuello, exposición a sustancias del medio ambiente laboral (sílice, asbesto, gases de diésel, solventes, formaldehído, polvo de madera, algodón, cuero y granos). Si desea conocer los cuestionarios los puede usted revisar. También le solicito su autorización para usar una pequeña parte de la muestra del tejido con cáncer que se le retiró durante su cirugía con fines de diagnóstico/tratamiento por cáncer de cabeza y cuello por su médico tratante y que se encuentran almacenadas en el archivo del servicio de patología de su hospital, con la finalidad de buscar una serie de partículas (subunidades de receptores nicotínicos de acetilcolina). Con sus respuestas se podrá observar si existe una relación entre los pacientes con antecedente de exposición o sin exposición al humo de tabaco y la presencia o no de estas partículas en las células de cáncer.
Posibles riesgos y molestias:	Los principales inconvenientes son que se llevará a cabo una entrevista durante su consulta de seguimiento en el servicio de Cirugía de Cabeza y Cuello del centro hospitalario donde recibe atención médica, con una duración aproximada de 15 minutos, que se ejecutará en una sola ocasión. Su participación sería voluntaria y no modificaría de ninguna manera el derecho a los servicios que le ofrece el IMSS.
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	Ninguno. Con sus respuestas se podrá observar si existe una relación entre los pacientes con antecedente de exposición o sin exposición al humo de tabaco y la presencia o no de estas partículas en las células de cáncer
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	Ninguna
Participación o retiro:	En caso de aceptar, en todo momento usted conservaría el derecho de no contestar la encuesta, sin que esto afectara de ninguna manera la atención que usted recibe en el IMSS.
Privacidad y confidencialidad:	La información que nos proporcione, tanto de su persona, como de su salud y los resultados de las pruebas que se le efectuarían, será guardada de manera confidencial, en el Centro Médico Nacional "La Raza" del IMSS, en caso de difundirse los resultados del estudio, por cualquier medio, esto se haría sobre el grupo que haya participado, sin revelar la identidad o los datos personales de ninguno de los participantes.

En caso de colección de material biológico (si aplica):

<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>

No autoriza que se tome la muestra.

Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.

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

Disponibilidad de tratamiento médico en derechohabientes (si aplica): Ninguno

Beneficios al término del estudio: Ninguno

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigador Responsable:

Si usted desea hacer preguntas o ampliar esta información, tengo la mejor disposición de responder a sus preguntas, así como de repetir o ampliar la explicación de todo lo que le he descrito. Dra. Beatriz Montaña Velázquez

Colaboradores:

Dr. Juan Carlos Benavides.

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 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx

Nombre y firma del sujeto

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

Nombre, dirección, relación y firma

Nombre, dirección, relación y firma

Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de investigación, sin omitir información relevante del estudio

Anexo 4. PROTOCOLO INMUNOHISTOQUIMICA

Libre de Biotina/Peroxidasa/DAB en 2 pasos

FUNDIR PARAFINA.	30 min.-24 hrs.	56 °C-59 °C.
DESPARAFINAR	Xilol	1 X 5 min.
	Xilol	1 X 30 seg.
HIDRATAR	ETOH Abs Anh – ETOH degradados-Agua destilada	2 c/u por 30 seg.
**DESENMASCARAMIENTO	Horno de microondas/olla de presión	1 X 5 min, con E. D. T. A.
REPOSO	Sumergir en agua fría	1 X 5-10 min.
**DIGESTIÓN ENZIMÁTICA	Temperatura ambiente	1 X 6 min. Proteínasa K
LAVADO	Agua destilada.	2 X 30 seg.
BLOQUEO PEROX. ENDO.	H ₂ O ₂ 0.9%	1 X 5 min.
LAVADO	PBST ó TBST	1 X 4 min.
***BLOQUEO DE PROTEÍNAS	BSA 1% ó Comercial	1 X 5 min.
ANTICUERPO PRIMARIO	Temperatura ambiente.	1 X 30- 45 min.
LAVADO	PBST ó TBST	1 X 4 min.
ANTICUERPO post primario	Temperatura ambiente.	1 X 10-30 min (según marca).
LAVADO	PBST ó TBST	1 X 4 min.
Polímero HRP	Temperatura ambiente.	1 X 10-30 min (según marca)
LAVADO	PBST ó TBST	1 X 4 min.
DAB	Temperatura ambiente.	Monitorear al microscopio.
LAVADO	Agua corriente (llave)	Contenedor plástico
CONTRASTE	HEMATOXILINA DE Lillie-Mayer's	30 seg.
DEGRADACIÓN DE COLOR	NH ₄ OH 0.37 M.	30-60 seg.
LAVADO	Agua corriente (llave)	2-3 cambios.
DESHIDRATAR	Agua- ETOH degradados- ETOH Abs. Anhidro	2 c/u por 30 seg.
SECAR	Campana de extracción	Temperatura ambiente.
MONTAR Y CUBRIR	Resina sintética	
OBSERVAR RESULTADOS AL MICROSCOPIO		

**Ver procedimiento específico al Ab que se va a detectar.

***Opcional según marca del kit de detección.
(Modificación de García Vázquez F J. 2005)

Anexo 5. Reactivos de la Encuesta Nacional de Adicciones 2008 para Tabaco y Alcohol

Por favor, conteste cada una de las preguntas con respecto a su exposición al humo de tabaco durante su vida, previo a la realización de su cirugía.

TABACO

1.- ¿Fumó usted tabaco alguna vez en su vida, aunque sea una sola fumada?

Si___

Años___

¿Cuántos años tenía cuando fumó tabaco por primera vez, aunque fuera una sola fumada de un cigarro, de un puro o de una pipa?

Antes de los 12 años

Antes de los 20 años

Después de los 20 años

No___

2.- ¿Le molestaba que la gente fumara cerca de usted?

Si___

No___

3.- De las personas con las que convivió a diario ¿cuántas de ellas fumaban...

Dentro de su casa?___ ___

En el salón de clases?___ ___

En su lugar de trabajo? ___ ___

NO APLICA_____

4.- En toda su vida ¿fumó más de 100 cigarrillos, es decir, 6 cajetillas?

Si___

No___

NO APLICA_____

5.- ¿Con qué frecuencia fuma actualmente?

Todos los días___

Algunos días___

No fumo actualmente_____

6.- ¿En alguna época de su vida fumó a diario?

Si___

No___

NO APLICA_____

7.- ¿A qué edad inició el consumo diario de tabaco?

Años: ____ ____

Antes de los 12 años____

Antes de los 20 años____

Después de los 20 años____

8.- ¿Cuántos años ha fumado o fumó usted, a diario?

AÑOS ____ ____ **MESES** ____ ____

NO APLICA____

9.- ¿Cuántos cigarros se fuma o fumó por día?

Menos de 16 cigarros____

De 16 a 25 cigarros____

Más de 26 cigarros____

NO APLICA____

10.- ¿Cuándo fue la última vez que se fumó un cigarro?

En los últimos 30 días____

Más de un mes pero menos de 6 meses____

Hace 6 meses o más pero menos de 1 año____*

Hace 1 año o más pero menos de 3 años____

Hace más de 3 años____

NO APLICA____

SECCIÓN DE FUMADOR ACTIVO

11.- ¿Cuántos cigarros fuma o fumó y con qué frecuencia?

Diario.....__ __

Semanal.....__ __

Mensual.....__ __

Ocasional.....__ __

Al menos una vez al año __ __

NO APLICA____

12.- ¿Alguna vez intentó dejar de fumar?

Si____

No___

NO APLICA___

SECCIÓN DE EX FUMADOR

13.- ¿Hace cuántos años dejó de fumar?

Años ___ ___

NO APLICA___

14.- ¿Qué edad tenía la última vez que fumó?

AÑOS ___ ___

Antes de los 12 años___

Antes de los 20 años___

Después de los 20 años___

NO APLICA_____

15.- Cuando fumaba, ¿con qué frecuencia y cuántos cigarros consumía?

Frecuencia ____ cantidad

Diario ____ ____

Semanal ____ ____

Mensual ____ ____

Ocasional ____ ____

Al menos una vez al año ____ ____

NO APLICA ____

ALCOHOL

Ahora le voy a hacer algunas preguntas relacionadas con su consumo de bebidas alcohólicas durante su vida previo a la realización de su cirugía.

1.- ¿Consumió alguna vez cualquier bebida que contenga alcohol?

1.- ¿Consumió alcohol al menos una vez en su vida?

Si ____

No ____

2.- En los últimos 12 meses previos a su cirugía, ¿Tomó alguna bebida que contuviera alcohol? (cerveza, pulque, vino, brandy, whisky, ron, tequila, coolers, presidencola, etc.,)

Si ____

No ____

3.- ¿Qué edad tenía la última vez que tomó una bebida alcohólica en su vida?

AÑOS:

Antes de los 12 años___

Antes de los 20 años___

Después de los 20 años___

No sabe/No contesta___

4.- Piense en su consumo total de alcohol, usualmente ¿Con qué frecuencia tomaba usted cualquier tipo de bebida que contuviera alcohol – ya sea vino, cerveza, whisky o cualquier otra bebida?

Si usted tuviera un promedio durante los últimos doce meses previos a su cirugía,

¿Cuál sería su frecuencia?

Tres o más veces al día___

Dos veces al día___

Una vez al día___

Casi todos los días (6-8 veces por semana)___

Tres o cuatro veces a la semana___

Una o dos veces a la semana___

Dos o tres veces al mes___

Aproximadamente una vez al mes___

De siete a once veces al año____

De tres a seis veces al año____

Dos veces al año____

Una vez al año____

NO APLICA____

5.- En los últimos 30 días, ¿Tomó alguna bebida que contenga alcohol? (cerveza, pulque, vino, brandy, whisky, ron, tequila, coolers, presidencola, etc.)

Si____

No____

NO APLICA____

6.- Cuando toma bebidas alcohólicas como cerveza, destilados, coolers, etc., generalmente, ¿Cuántas copas toma usted en cada ocasión?

Número de copas____

NO APLICA_____

7.- Durante los últimos 12 meses previos a su cirugía, ¿Cuál es el mayor número de copas que usted ha bebido en un solo día?

24 o más copas en un solo día_____

De 12 a 23 copas en un solo día_____

De 8 a 11 copas en un solo día_____

De 5 a 7 copas en un solo día_____

4 copas en un solo día_____

De 1 a 3 copas en un solo día_____

NO APLICA_____

8.- Indicar la frecuencia de su consumo:

1) a diario?___

2) casi a diario (6 a 8 veces por semana)?___

3) de tres a cuatro veces a la semana?___

4) de una a dos veces a la semana?___

5) de dos a tres veces al mes?___

6) una vez al mes?___

7) de siete a once veces al año?___

8) de tres a seis veces al año?___

9) dos veces al año?___

10) una sola vez al año?___

11) NUNCA___

12) NO APLICA

BIBLIOGRAFÍA

1. Stewart BW and Kleihues P: World Cancer Report, Geneva: International Agency for Research on Cancer. pp. 232-236, 2003.
2. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer* 2013; 132:1133.
3. Lambert R, Sauvaget C, de Camargo Cancela M, Sankaranarayanan R. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23:633.
4. Wright SC, Zhong J, Zheng H and Larrick JW: Nicotine inhibition of apoptosis suggests a role in tumor promotion. *FASEB J* 7: 1045-1051, 1993.
5. DGE. SSA, Registro Histopatológico de las Neoplasias en México, 2002
6. Gallegos-Hernández José Francisco, Paredes-Hernández Eduardo, Flores-Díaz Rutilio, Minauro-Muñoz Gabriel, Apresa-García Teresa, Hernández-Hernández Dulce María. Virus del papiloma humano asociado con cáncer de cabeza y cuello. *Cir Ciruj* 2007;75:151-15
7. Sankaranarayanan R, Masuyer E, Swaminathan R, et al. Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis. *Anticancer Res* 1998; 18:4779.
8. Tachezy R, Rubenstein L, Smith E, Saláková M, Smahelová J, Luduiková V, Rotnaglova E, et al. Demographic and risk factors in patients with head and neck tumors. *J Med Virol* 2009; 81: 878-887.
9. Battista G, Comba P, Orsi D, Norpoth K, Maier A. Nasal cancer in leather workers: an occupational disease. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1995; 121: 1-6
10. Bradley PJ: Radiation-induced tumours of the head and neck. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2002, 10:97–103.
11. Boffetto P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol.* 2006; 7: 149-156
12. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988; 48:3282.

13. Kato I, Nomura AM. Alcohol in the aetiology of upper aerodigestive tract cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1994; 30B:75.
14. De Stefani E, Boffetta P, Oreggia F, et al. Hard liquor drinking is associated with higher risk of cancer of the oral cavity and pharynx than wine drinking. A case-control study in Uruguay. *Oral Oncol* 1998; 34:99.
15. Lewin F, Norell SE, Johansson H, et al. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. *Cancer* 1998; 82:1367.
16. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:777.
17. Spitz MR. Epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Oncol* 1994; 21:281.
18. Andre K, Schraub S, Mercier M, Bontemps P. Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: a case-control study in the Doubs region of France. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995; 31B:301.
19. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:777.
20. Tan EH, Adelstein DJ, Droughton ML, et al. Squamous cell head and neck cancer in nonsmokers. *Am J Clin Oncol* 1997; 20:146
21. WJ Blot, JK McLaughlin, DM Winn, DF Austin, RS Greenberg, S Preston-Martin, L Bernstein, JB Schoenberg, A Stemhagen, JF Fraumeni Jr. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*, 1998; 48: 3282-3287
22. Herity B, Moriarty M, Burke BJ. A case control study of head and neck cancer in the Republic of Ireland . *Br J. Cancer* 1981; 43: 177
23. Sloan D, Goepfert H. Conventional Therapy of the head and neck. In *Hematology Oncology Clinics of North Am.* 1991; 5: 601-625

24. Wyss A, Hashibe M, Chuang SC, et al. Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Am J Epidemiol* 2013; 178:679.
25. WHO Report on the global tobacco epidemic, 2009. <http://whqlibdoc.who.int/publications/2009> (consultado 10/04/2016)
26. Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología. Encuesta Nacional de Adicciones 2008 (ENA-2008). México 2008
27. Spitz MR, Fueger JJ, Goepfert H. Squamous cell carcinoma of the aerodigestive tract. A case comparison analysis. *Cancer* 1988; 61: 203
28. Lee Y, Marron M, Benhamous S, Bouchardy C, Ahrens W, Laggiou P, et al. Active and involuntary tobacco smoking and upper aerodigestive tract cancer risks in a multicenter case control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009 18; 3353
29. Firth NA. Marijuana use and oral cancer: a review. *Oral Oncol* 1997; 33:398.
30. Schuller H, Jull B, Sheppard B, Plummer III H. Interaction of tobacco-specific toxicants with the neuronal α_7 nicotinic acetylcholine receptor and its associated mitogenic signal transduction pathway: potential role in lung carcinogenesis and pediatric lung disorders. *Eur J Pharmacol* 2000; 393: 265-277
31. Arredondo J, Chernyavsky A, Marubio L, Beudet 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; 2: 597-613
32. Scherer G, Conze C, von Meyerinck L, Sorsa M, Adlkofer F. Importance of exposure to gaseous and particulate phase components of tobacco smoke in active and passive smokers. *Int Arch Occup Environ Health* 1990; 62; 6:459-466
33. Wright SC, Zhong J, Zheng H and Larrick JW: Nicotine inhibition of apoptosis suggests a role in tumor promotion. *FASEB J* 7: 1045-1051, 1993.
34. Arredondo J, Chernyavsky AI and Grando SA: Nicotinic receptors mediate tumorigenic action of tobacco-derived nitrosamines on immortalized oral epithelial cells. *Cancer Biol Ther* 5: 511-517, 2006.

35. Schuller H, Orloff M. Tobacco-specific carcinogenic nitrosamines. Ligands for nicotinic acetylcholine receptors in human lung cancer cells. *Biochem Pharmacol* 1998;55:1377-1384.
36. Schuller H, Orloff M. Tobacco-specific carcinogenic nitrosamines. Ligands for nicotinic acetylcholine receptors in human lung cancer cells. *Biochem Pharmacol* 1998;55:1377-1384.
37. S.A. Grando, Connections of nicotine to cancer, *Nat. Rev. Cancer* 14 (2014) 419–429.
38. S. Patel, K. Shah, S.Mirza, A. Daga, R. Rawal, Epigenetic regulators governing cancer stem cells and epithelial–mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma, *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 10 (2015) 140–152.
39. M.R. Improgo, L.G. Soll, A.R. Tapper, P.D. Gardner, Nicotinic acetylcholine receptors mediate lung cancer growth, *Front. Physiol.* 4 (2013) 251.
40. C. Schaal, S.P. Chellappan, Nicotine-mediated cell proliferation and tumor progression in smoking-related cancers, *Mol. Cancer Res.* 12 (2014) 14–23.
41. S.Wang, K. Takayama, K. Tanaka, M. Takeshita, N. Nakagaki, K. Ijichi, et al., Nicotine induces resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor by alpha1 nicotinic acetylcholine receptor-mediated activation in PC9 cells, *J. Thorac. Oncol.* 8 (2013) 719–725.
42. Battista G, Comba P, Orsi D, Norpoth K, Maier A. Nasal cancer in leather workers: an occupational disease. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1995; 121: 1-6
43. Itier V, Bertrand D. Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function; *FEBS Letters* 2001; 504; 118-125.
44. Maus A, Pereira E, Karachunski P, Horton D, Navaneetham D, Macklin K et al. Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 1998; 54; 779-788.

45. Onoda N, Nehmi A, Weiner D, Mujumdar S, Christen R and Los G: Nicotine affects the signaling of death pathway, reducing the response of head and neck cancer cell lines to DNA damaging agents. *Head Neck* 23: 860-870, 2001.
46. Arredondo J, Chernyavsky AI and Grando SA: Nicotinic receptors mediate tumorigenic action of tobacco-derived nitrosamines on immortalized oral epithelial cells. *Cancer Biol Ther* 5: 511-517, 2006.
47. West AK, Brognard J, Clark SA, Linnoila IR, Yang X, Swain SM, Harris C, Belinsky S and Dennis PA: Rapid Akt activation by nicotine and tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells: *J Clin Invest* 111: 81-90, 2003.
48. Lee Y, Marron M, Benhamous S, Bouchardy C, Ahrens W, Lagiou P, et al. Active and involuntary tobacco smoking and upper aerodigestive tract cancer risks in a multicenter case control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009 18; 3353
49. Pedrero JM, Carracedo DG, Pinto CM, Zapatero AH, Rodrigo JP, Nieto CS and Gonzalez MV: Frequent genetic and biochemical alterations of the PI3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma: *Int J Cancer* 114: 242- 248, 2005.
50. Zia S, Ndoye A, Nguyen V, Grando S. Nicotine enhances expression of the alpha 3, alpha 4, alpha 5 and alpha 7 nicotinic receptors modulating calcium metabolism and regulating adhesion and motility of respiratory epithelial cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997; 97; 3: 243-262
51. Deutch A, Holliday J, Roth R, Chun L, Hawrot E. Immunohistochemical localization of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84; 23: 8697-8701
52. Song P, Sekhon H, Jia Y, Keller J, Krzysztof Blusztajn J, Mark G et al. Acetylcholine Is Synthesized by and Acts an Autocrine Growth Factor for Small Cell Lung Carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:214-221.
53. Plummer III H, Dhar M, Schuller H. Expression of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in human lung cells. *Respir Res* 2005; 6:29.

54. Grando S, Horton R, Pereira E, Diethelm B, George P, Albuquerque E. et al. A Nicotinic Acetylcholine Receptor Regulating Cell Adhesion and Motility Is Expressed in Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1995;105:774-781.
55. Wang Y, Pereira E, Maus A, Ostlie N, Navaneetham D, Lei S. et al. Human Bronchial Epithelial and Endothelial Cells express $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 2001;60:1201-1209.
56. 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
57. Keiger C, Case L, Kendal-Reed M, Jones K, Drake A, Walker J. Nicotinic cholinergic receptor expression in the human nasal mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003;112:77-84.
58. Dasgupta P, Rizwani W, Pillai S, Kinkade R, Kovacs M, Rastogi S, et al. Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. *Int J Cancer* 2009;124; 9: 36-45.
59. Song P, Sekhon H, Fu X, Maier M, Jia Y, Proskosil B, et al. Activated Cholinergic Signaling Provides a Target in Squamous Cell Lung Carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68; 4693-4700 .
60. West AK, Brognard J, Clark SA, Linnoila IR, Yang X, Swain SM, Harris C, Belinsky S and Dennis PA: Rapid Akt activation by nicotine and tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells: *J Clin Invest* 111: 81-90, 2003.
61. 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; 3: 151-158
62. 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.
63. Hung R, McKay J, Gaborieau V, Boffetta P, Hashibe M, Zaridze D, et al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature* 2008; 452: 633-637.
64. Angel G: Interpretación clínica del laboratorio Santafé de Bogotá Ed. Panamericana 2000. Angel G: Inmunofluorescencia
65. 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
66. Li Q, Zhou XD, Kolosov VP, Perelman JM (2011) Nicotine reduces TNF- α expression through a α 7 nAChR/MyD88/NF- κ B pathway in HBE16 airway epithelial cells. *Cell Physiol Biochem* 27: 605–612.
67. Taslim N, Saeed DM (2011) The role of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) α 7 subtype in the functional interaction between nicotine and ethanol in mouse cerebellum. *Alcohol Clin Exp Res* 35: 540–549.
68. Kuryatov A, Berrettini W, Lindstrom J (2011) Acetylcholine receptor (AChR) α 5 subunit variant associated with risk for nicotine dependence and lung cancer reduces (α 4 β 2)(2) α 5 AChR function. *Mol Pharmacol* 79: 119–125.
69. Pries R, Wollenberg B. Cytokines in head and neck cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*; 2006;17:141–146
70. Pedrero JM, Carracedo DG, Pinto CM, Zapatero AH, Rodrigo JP, Nieto CS and Gonzalez MV: Frequent genetic and biochemical alterations of the PI3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma: *Int J Cancer* 114: 242- 248, 2005.
71. West AK, Brognard J, Clark SA, Linnoila IR, Yang X, Swain SM, Harris C, Belinsky S and Dennis PA: Rapid Akt activation by nicotine and tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells: *J Clin Invest* 111: 81-90, 2003.

72. 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.
73. Aistrup G, Marszalec W, Narahashi T. Ethanol modulation of nicotinic acetylcholine receptor currents in cultured cortical neurons. *Mol Pharmacol* 1999; 55: 39–49.
74. Owens J, Balogh S, McClure-Begley T, Butt C, Labarca C, Lester H, Picciotto M, et al. $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors Modulate the Effects of Ethanol and Nicotine on the Acoustic Startle Response. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 2003; 27; 12: 1867-1875.
75. National Institute of Cancer Dictionary of Cancer Terms TNM staging system <http://www.cancer.gov/dictionary/?Cdrid=256577>. (consultado 12/04/2016)
76. Minna JD: Nicotine exposure and bronchial epithelial cell nicotinic acetylcholine receptor expression in the pathogenesis of lung cancer. *J Clin Invest* 111: 31-33, 2003.
77. West AK, Brognard J, Clark SA, Linnoila IR, Yang X, Swain SM, Harris C, Belinsky S and Dennis PA: Rapid Akt activation by nicotine and tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells: *J Clin Invest* 111: 81-90, 2003.
78. Chu M, Guo J and Chen CY: Long-term exposure to nicotine, *via* Ras pathway induces cyclin D1 to stimulate G1 cell cycle transition. *J Biol Chem* 280: 6369-6379, 2005.
79. Epithelial Cell Nicotinic Acetylcholine Receptor Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Pathogenesis DARIO GARCIA CARRACEDO, JUAN PABLO RODRIGO^{1,2}, CARLOS SUAREZ NIETO and MARIA VICTORIA GONZALEZ *Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, Obra Social CajAstur (IUOPA), and 2Servicio de Otorrinolaringología Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), c/ Celestino Villamil s/n, 33006 OVIEDO, Asturias, Spain*

80. Weller B. 1997. Diccionario enciclopédico de ciencias de la salud. McGraw-Hill Interamericana
81. Council of Europe. European Treaty Series. No 164. Oviedo, 4.IV.1997. Convention for the protection of human rights and dignity of the human being with regard to the application of biology and medicine: Convention on human rights and biomedicine
82. UNESCO: Universal Declaration on Bioethics and Human Rights, October 2005
(http://portal.unesco.org/shs/en/ev.phpURL_ID=1883&URL_DO=TOPIC&URL_SECTION=201.html) (consultado 12/04/2016)
83. Norma Oficial Mexicana NOM-010-STPS-1994 Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo donde se produzcan, almacenen o manejen sustancias químicas capaces de generar contaminación en el medio ambiente laboral.
84. Conyemr R, Medina M, Sepulveda J, De la Fuente R, Kumate J. La Encuesta Nacional de Adicciones de México. Salud Pública Méx 1990; Vol. 32(5):507-522
85. Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología. Encuesta Nacional de Adicciones 2008 (ENA-2008). México 2008
86. Conyemr R, Medina M, Sepulveda J, De la Fuente R, Kumate J. La Encuesta Nacional de Adicciones de México. Salud Pública Méx 1990; Vol. 32(5):507-522
87. Real Academia de la Lengua Española. Diccionario de la lengua española, vigésimas segunda edición.
[http://buscon.rae.es/drae/SrvltConsulta?TIPO_BUS=3&LEMA=sexo.](http://buscon.rae.es/drae/SrvltConsulta?TIPO_BUS=3&LEMA=sexo) (consultado 20/04/2016)
88. National Institute of Cancer. Diccionario de cáncer. Tiempo de evolución
<http://www.cancer.gov/diccionario/?CdrID=44783> (consultado 20/04/2016)

89. National Institute of Cancer Dictionary of Cancer Terms TNM staging system <http://www.cancer.gov/dictionary/?CdrID=256577> (consultado 20/04/2016)
90. Genome Browser. 2010. Human Gene Sorter, palabras de búsqueda: CHRNA3, CHRNA4, CHRNA 5, CHRNA7 y CHRNB2, <http://genome.ucsc.edu> (consultado 20/04/2016)
91. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud. 1986. Título Segundo. De los aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos. Capítulo 1. Artículo 17
92. US Department of Health and Human Services. 2005. Guidelines for the Conduct of Research Involving Human Subjects at the National Institutes of Health. 5th Printing
93. Council of Europe. European Treaty Series. No 164. Oviedo, 4.IV.1997. Convention for the protection of human rights and dignity of the human being with regard to the application of biology and medicine: Convention on human rights and biomedicine
94. UNESCO: Universal Declaration on Bioethics and Human Rights, October 2005 (http://portal.unesco.org/shs/en/ev.phpURL_ID=1883&URL_DO=TOPIC&URL_SECTION=201.html) (consultado 20/04/2016)
95. Johnson, G.K, and aquier, C.A (1993) Smokeless tobacco use by youth: a health concern, *ped. Dent* 15, 169-174.
96. J Sugar, J., Vereczkey, I., and Toth, J. 1996) Some etio-pathogenetic factors in laryngeal carcinogenesis. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 15, 195–199.
97. Benowitz, N. L. (1997) Systemic absorption and effects of nicotine from smokeless tobacco. *Adv. Dental Res.* 11, 336–341
98. Conti-Fine, B. M., Navaneetham, D., Lei, S., and Maus, A. D. (2000) Neuronal nicotinic receptors in non-neuronal cells: new mediators of tobacco toxicity? *Eur. J. Pharmacol.* 393, 279–294
99. Dunckley, T., and Lukas, R. J. (2003) Nicotine modulates the expression of a diverse set of genes in the neuronal SH-SY5Y cell line. *J. Biol. Chem.* 278, 15633–15640

100. Plummer, H. K., 3rd, Dhar, M., and Schuller, H. M. (2005) Expression of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in human lung cells. *Respir. Res.* **6**, 29
101. Ehrhardt, A., Bartels, T., Klocke, R., Paul, D., and Halter, R. (2003) Increased susceptibility to the tobacco carcinogen 4- methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in transgenic mice overexpressing c-myc and epidermal growth factor in alveolar type II cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **129**, 71–75
102. Ye, Y. N., Liu, E. S., Shin, V. Y., Wu, W. K., and Cho, C. H. (2004) The modulating role of nuclear factor-kappaB in the action of alpha7-nicotinic acetylcholine receptor and cross-talk between 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in colon cancer growth induced by 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **311**, 123–130