



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN**



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UMAE: HOSPITAL GENERAL “DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA” CMN
“LA RAZA”**

TÍTULO

**EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN HABITUAL A HUMO DE TABACO
(FUMADOR ACTIVO) EN LA CANTIDAD DE CÉLULAS DE LANGERHANS
EN LA MUCOSA NASAL DE SUJETOS SIN ENFERMEDAD NASAL**

PRESENTA:

Dr. Jaime Arturo Zaragoza González

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO EN MÉDICO ESPECIALISTA EN:

OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO

TUTOR:

Dra. Bertha Beatriz Montaña Velázquez

Número de Registro: R-2006-3502-62

Ciudad Universitaria, CD. MX.

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Dictamen de Modificación Autorizada

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud **3502** con número de registro **18 CI 09 002 001** ante COFEPRIS
HOSPITAL GENERAL DR. GAUDINICIO GONZALEZ GARZA, CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA, D.F. NORTE

FECHA **30/04/2021**

DRA. BERTHA BEATRIZ MONTAÑO VELAZQUEZ

PRESENTE

Tengo el agrado de notificarte, que la modificación al protocolo de investigación en salud con título: **Efecto de la exposición habitual a humo de tabaco (fumador activo) en la cantidad de células de Langerhans en la mucosa nasal de sujetos sin enfermedad nasal** y con número de registro institucional: **R-2006-3502-62** y que consiste en:

Cambio de alumnos

que sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **MODIFICACION AUTORIZADA**.

ATENTAMENTE


DR.(A). GUILLERMO CARRAGA REYNA
PRESIDENTE DEL COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA EN INVESTIGACIÓN EN SALUD No.3502

Imprimir

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
 Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
 Coordinación de Investigación en Salud

Solicitud de número de registro para protocolos de investigación autorizados

COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD 3502

FECHA 19/01/2007

Estimado Dr. (a).

P R E S E N T E

Informo a usted que el protocolo de investigación en salud titulado:

Efecto de la exposición habitual a humo de tabaco (fumador activo) en la cantidad de células de Langerhans en la mucosa nasal de sujetos sin enfermedad nasal

fue sometido a consideración de este Comité Local de Investigación en Salud por el **Bertha Beatriz Montaña Velazquez**.

De acuerdo con las recomendaciones emitidas por los revisores e integrantes del CLIS y tomando en cuenta que el protocolo de investigación cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética médica y de investigación vigentes, el dictamen fue: **A U T O R I Z A D O**.

Para dar cumplimiento a la normativa vigente, el protocolo de investigación fue enviado para su evaluación y dictamen a los Comités Locales de Investigación en Salud, que a continuación se enlistan:

Comité Local de Investigación en Salud Núm.	Unidad Sede del CLIS
3502	HOSPITAL GENERAL Dr. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA, CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA

En consecuencia, solicito a usted que una vez recibido el dictamen de autorización de los CLIS antes señalados, notifique a este Comité, el número de registro asignado.

Atentamente

Dr(a). JAIME ZALDIVAR CERVERA
 Presidente del Comité Local de Investigación en Salud Núm 3502

DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN HABITUAL A HUMO DE TABACO (FUMADOR ACTIVO) EN LA CANTIDAD DE CÉLULAS DE LANGERHANS EN LA MUCOSA NASAL DE SUJETOS SIN ENFERMEDAD NASAL

Alumno:

Dr. Jaime Arturo Zaragoza González

jimmyzg9@hotmail.com

Médico residente de cuarto año adscrito al CMNR Hospital General Dr. Gaudencio González Garza La Raza, IMSS, Ciudad de México, Distrito Federal, Calzada Vallejo y Jacarandas S/N, CP 02990, Tel. 57245900, ext. 23446

Matrícula: 97364862.

Investigador responsable:

Dra. B. Beatriz Montaña Velázquez

beamont_2000@yahoo.com.mx


Médico Adscrito al servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello, HG CMN La Raza, IMSS, Ciudad de México, Distrito Federal, Calzada Vallejo y Jacarandas S/N, CP 02990, Tel. 57245900, ext 23446.

Matrícula: 10934855


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



HOJA DE FIRMAS



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




**DR. GUILLERMO PIÑA URIBE
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA
DE CABEZA Y CUELLO**



**DR. SILVIO JURADO HERNÁNDEZ
JEFE DE SERVICIO DE OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y
CUELLO**



**DRA. B. BEATRIZ MONTAÑO VELÁQUEZ
INVESTIGADOR PRINCIPAL Y MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE
OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO**



**DR. JAIME ARTURO ZARAGOZA GONZÁLEZ
RESIDENTE DE CUARTO AÑO DE OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE
CABEZA Y CUELLO**

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres por la paciencia y comprensión mientras estos estudios se realizaban. Además deseo hacer agradecer con mucho cariño en particular a la Dra. Beatriz Montaña por la dedicación, paciencia, enseñanzas y consejos para la elaboración de este trabajo, ya que fue una parte fundamental; además de las siguientes personas: Dra. Liliana Sandoval, Dr. Guillermo Piña por su apoyo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	8
ANTECEDENTES	9
JUSTIFICACIÓN	15
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	16
OBJETIVO.....	16
HIPÓTESIS.....	16
TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO.....	16
VARIABLES.....	17
MATERIAL Y MÉTODOS	19
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23
CONSIDERACIONES ETICAS.....	23
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIÓN.....	28
BIBLIOGRAFÍA.....	29

RESUMEN

TÍTULO

Efecto de la exposición habitual a humo de tabaco (fumador activo) en la cantidad de células de Langerhans en la mucosa nasal de sujetos sin enfermedad nasal.

OBJETIVO

Se identificó y comparó la cantidad de células de Langerhans CD1a+ y Langerina+ en la mucosa nasal de sujetos sin enfermedad nasal, expuestos (fumador activo) y no expuestos de forma habitual a humo de tabaco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo la captación de 29 sujetos por dos médicos residentes del Servicio de Otorrinolaringología, quienes invitaron a participar a médicos residentes voluntarios sin enfermedad nasal previa firma de carta de consentimiento informado. A todos los participantes se les identificó la exposición habitual (fumador activo) o no a humo de tabaco con el cuestionario de la Encuesta Nacional de Adicciones (ENA 2002), el cual es auto administrado. También se efectuó la determinación de la concentración de cotinina en orina en ng/ml ajustado a la concentración de creatinina. A todos los sujetos se les solicitó muestra de orina al ingreso del estudio y dentro de las 24 horas, para las determinaciones de cotinina. Posteriormente se obtuvo una biopsia de la mucosa nasal del cornete inferior la cual se colocó en formaldehído al 4% hasta su procesamiento con la técnica de microscopia de luz. Una vez que se completo la captación de pacientes, las muestras se enviaron para su procesamiento al laboratorio. Se identificó la presencia de células de Langerhans CD1a+ y Langerina+ en la mucosa nasal con inmunohistoquímica. Antes de realizar el estudio se realizó el ajuste de los procedimientos y de las técnicas de laboratorio.

RESULTADOS

En nuestro estudio se incluyeron 29 pacientes, de los cuales 14 (48.2%) fueron de sexo masculino y 15 (51.7%) femenino. Se determinó que 16 (55%) estuvieron expuestos a humo de tabaco 11 (69%) hombres y 5 (31%) mujeres, de los cuales 15 (93.7%) fueron fumadores activos y actualmente con exposición al tabaco en los últimos dos días. En los cortes de tejido de las biopsias de mucosa nasal de 2 mm identificamos integridad del epitelio y la lámina propia, no se identificó la presencia de células de langerhans CD1a+ y Langerina+ en la mucosa nasal con inmunohistoquímica, tanto en el grupo de fumadores como los no fumadores.

CONCLUSIÓN

En este estudio no se identificaron células de Langerhans CD1a+ y Langerina+ en la mucosa nasal de sujetos sanos, de igual manera, no se demostró algún efecto ante la exposición al humo de tabaco en la cantidad de dichas células en la mucosa nasal en sujetos sanos. La cantidad de células de Langerhans en la vía superior es menor a lo identificado en la vía aérea inferior de sujetos sanos, aún no se ha documentado el efecto del tabaco en las células de Langerhans en la vía respiratoria superior. Es deseable buscar en otras enfermedades nasosinusales como la rinitis alérgica si se estimula el reclutamiento de estas células ante la exposición al humo de tabaco.

Palabras clave: células de Langerhans, mucosa nasal, tabaco.

Key words: Langerhans cells, nose, tobacco smoke

ANTECEDENTES

Fisiopatología de células de Langerhans

Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno que presentan dos orígenes, uno de precursores hematopoyéticos y otro de monocitos periféricos. Se encuentran como células inmaduras en los epitelios de mucosas y piel a la entrada de los posibles antígenos (se conocen en estos sitios como células de Langerhans) y que exhiben la característica fagocítica de captura y procesamiento antigénico, con la capacidad de iniciar una respuesta inmune a través de la activación de los linfocitos T. Estas células transitan y migran desde cualquier tejido no linfoide como piel y mucosas a los tejidos linfoides como el bazo y los ganglios linfáticos a través de cambios fenotípicos y funcionales como la expresión de diferentes moléculas de adhesión (proceso de maduración).¹

La primera etapa constituye el procesamiento del antígeno por las células de Langerhans o células dendríticas inmaduras con la captación del antígeno por endocitosis y su degradación hasta péptidos pequeños que se unen a las moléculas HLA clase I y clase II. Luego, estas células presentan cambios a través de señales inducidas por el antígeno y la presencia de mediadores proinflamatorios (secreción de citoquinas y quimiocinas) para transformarse en una célula madura. Este proceso de maduración involucra la presencia de la expresión de CD40L, complejos péptido antigénico-HLA estables, moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) y de adhesión. En esta etapa pierden su capacidad de captura de antígenos. Luego, estas células migran a través de los linfáticos en busca de los linfocitos T de los nódulos linfáticos y del bazo. La unión de CD40 de la superficie de las células dendríticas maduras con el CD40L expresado por las células T, promueve el incremento en la expresión de CD80, CD86 y la secreción de interleucina 12 por las células dendríticas. La interleucina 12 estimula el desarrollo de los linfocitos Th1 y la maduración de los linfocitos T citotóxicos que se trasladan a los sitios de inflamación o a la entrada de antígenos para realizar sus actividades propias.^{1,2,3,4}

Las células de Langerhans se caracterizan por la presencia de gránulos de Birbeck en su interior, además de la expresión de moléculas como CD1a y langerina.^{5,6,7} Por

microscopía fotónica, con la coloración de rutina de eosina y hematoxilina, las células de Langerhans presentan un aspecto dendrítico y un núcleo irregular usualmente ovoide, sin embargo, para su caracterización se requiere de estudios de inmunohistoquímica como la identificación de la adenosintrifosfatasa (ATPasa), la actividad de alfa naftil acetato esterasa o esterasa inespecífica, CD1a (moléculas presentadoras de antígeno lipídicos y glucolipídicos), la proteína S100 y los antígenos HLA-DR del complejo mayor de histocompatibilidad clase II.⁸ Casi todas las células de Langerhans que son CD1a positivas son HLA-DR positivas y ATPasa positivas,⁹ también expresan CD1c, pero débilmente.^{10,11} Expresan receptores únicos para la porción Fc de la IgG del tipo II (CD32)^{12, 13} y para la porción Fc de la IgE (Fcε-RI y Fcε-RII (CD23), implicados en la captación de alérgenos.^{14,15}

En los gránulos de Birbeck, se identifica la presencia de una glucoproteína de 40 kDa que es reconocida por el anticuerpo monoclonal Lag¹⁶ y por otro anticuerpo monoclonal llamado DCGM4, que al parecer identifican la misma molécula, que ha sido renombrada como Langerina, la cual es una lectina tipo II dependiente de Ca⁺⁺, con especificidad para manosa que captura antígenos y los canaliza hacia los gránulos de las células de Langerhans y así crear una vía no clásica de procesamiento de antígeno no dependiente de moléculas clase II ^{6,7}. Por microscopía electrónica se identifican los gránulos de Birbeck de las células de Langerhans (una estructura dinámica que participa al parecer en la transferencia de moléculas hacia el interior de la célula vía endocitosis mediada por receptor)¹⁷ que tienen la forma de una barra con una estructura central en forma de cremallera o de raqueta de tenis con una dilatación en uno de sus extremos. Las células de langerhans no presentan desmosomas, melanosomas ni tonofilamentos.^{5,18} Figura 1.

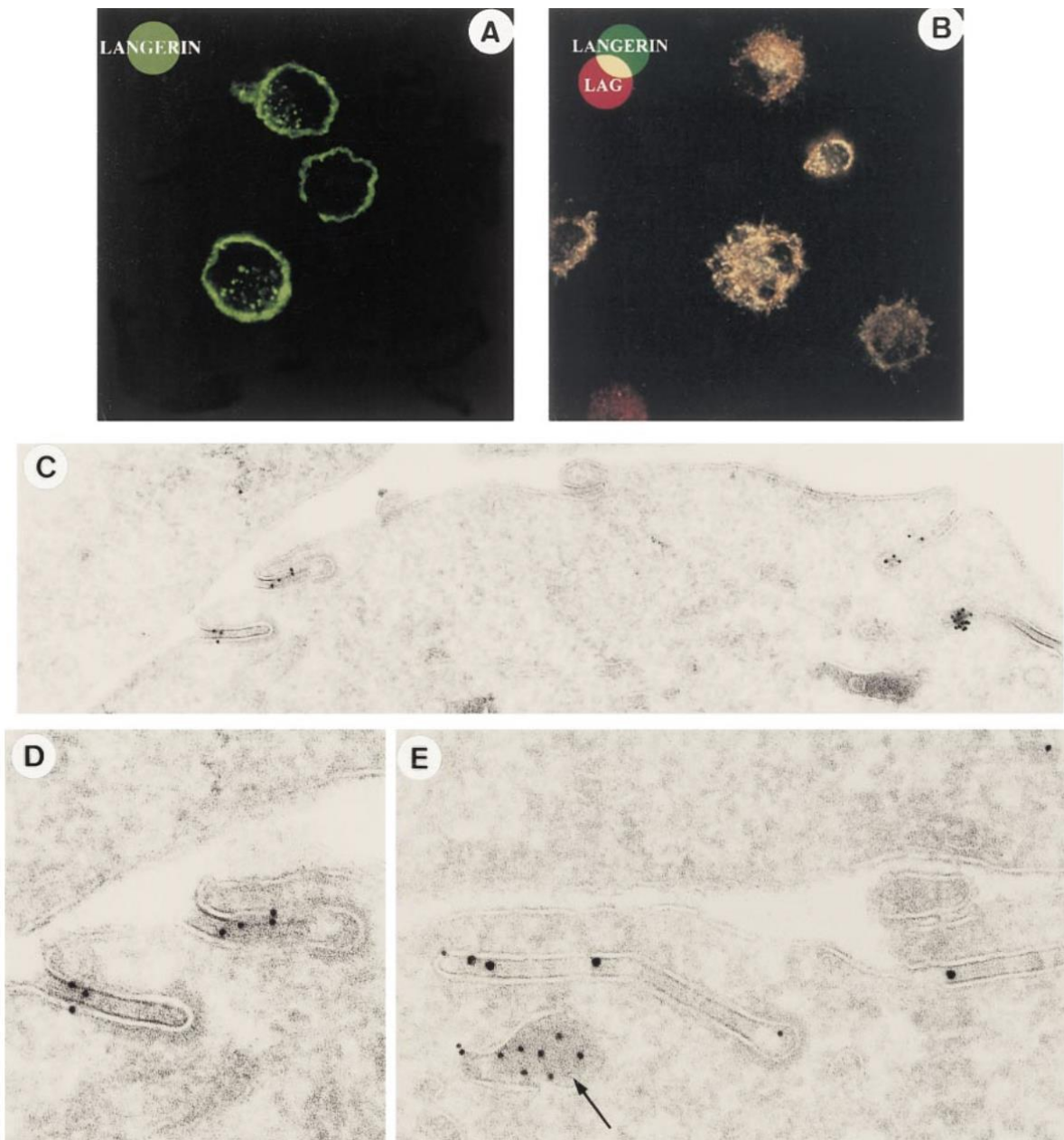


Figura 1. Langerina se asocia constitutivamente con CMS y BG. Las células de Langerhans derivadas de TGF β se fijaron y posteriormente se tiñeron y procesaron para microscopía láser confocal (A y B) o microscopía electrónica (C – E). (A) Langerina (verde) se detecta en la superficie de las células de langerhans, mientras que los epítomos anti-Langerina y anti-Lag (rojo) se localizan intracelularmente (amarillo) en células permeabilizadas (B). La langerina (oro de 10 nm) se asocia con estructuras intercaladas de citomembranas (CMS) y con gránulos de Birbeck intracelulares (BG) (C – D). Por el contrario, el doble inmunomarcado con DCGM4 (oro de 15 nm) y anti-MHC de clase II (oro de 10 nm) revela que Langerin está ausente en MIIC (flecha) (E).⁷

Langerhans y mucosa nasal

Las células de langerhans se localizan en el epitelio de piel y mucosas. En la epidermis se localizan en el estrato basal y espinoso¹⁹ y representan el 1 al 8% de la población total de células. En la mucosa bucal se han encontrado aproximadamente 890 células/mm².²⁰

En la mucosa nasal, las células de Langerhans CD1a positivas, en el epitelio se encuentran en las capas suprabasal y espinosa y en la lámina propia se encuentran en la capa subepitelial y alrededor del epitelio glandular.²⁰⁻²⁴ En biopsias con cortes de 0.4mm² y 2.2mm² de mucosa nasal (epitelio y lamina propia) de 15 sujetos sin enfermedad nasal, de 1 a 12 años de edad y con pruebas de alergia negativa, se encontró en el epitelio una mediana de células CD1a+ (Okt 6) de 293 (rango de 32 a 683) y en la lámina propia de 25 (0-90).²²

En otro estudio realizado en 12 sujetos con promedio de edad de 28 años, con enfermedad del oído y faringe, no relacionada con enfermedad de la nariz o senos paranasales (pacientes sanos) y con pruebas de alergia negativa, el promedio de células CD1a positivas por milímetro cuadrado en el epitelio fue de 20 (D.E. 14.1) y en la lámina propia de 4 (4).^{25, 26}

Exposición a humo de tabaco

Se ha sugerido que factores ambientales como la contaminación ambiental y la exposición a humo de tabaco tienen influencia en la cantidad de células de Langerhans en el epitelio de las vías respiratorias bajas.^{27,28} En seres humanos se ha identificado que la exposición a humo de tabaco modifica la cantidad de estas células en el epitelio de las vías respiratorias bajas.²⁹⁻³¹

La exposición a humo de tabaco puede ser activa o pasiva. Según la OMS y la ENA,^{32,33} se considera exposición activa al fumar más de 5 cigarrillos diarios o haber fumado más de 100 cigarrillos en la vida, mientras que la exposición pasiva se da al haber humo de tabaco en el ambiente sin que la persona este fumando, especialmente en ambiente

cerrado. Un fumador actual es el que ha fumado cigarros al menos un día en los últimos 30 días previos a ser interrogado.³⁴ En México, la Encuesta Nacional de Adicciones en el 2002, mostró que el 26.4% de la población entre 12 y 65 años del área urbana son fumadores activos (14 millones de personas) y de los fumadores el 58.2% (8,126,614) comenzó a fumar antes de los 18 años.³³ En el humo de tabaco se han identificado más de 4,700 compuestos, entre ellos la nicotina. Esta se absorbe por el tracto respiratorio, por la mucosa bucal y por la piel; el 80 a 90% de la nicotina se metaboliza en el hígado y el resto en pulmón y riñones.³⁵ Los principales metabolitos de la nicotina son la cotinina y el N-óxido de nicotina, por lo que la medición de estos permite evaluar la exposición a humo de tabaco, además de otros marcadores en sangre o en orina como carboxihemoglobina y tiocianato.³⁶ Estudios en adultos sin enfermedad muestran que la concentración media de cotinina en la orina en no fumadores es de 6.1 ng/ml, y en los fumadores activos es de 1 623 ng/ml.³⁷

Langerhans y tabaquismo

Hay evidencia que algunos componentes del humo del tabaco pueden actuar como antígenos que inducen la formación de anticuerpos en humanos y en animales, además de que se asocia a aumento de marcadores de alergia, sin embargo, estos hallazgos no son contundentes.^{38,39}

En el epitelio de la mucosa del borde lateral de la lengua de cadáveres de sujetos con antecedente de consumo de tabaco y alcohol, se ha identificado aumento del número de células de Langerhans. Lo anterior se ha explicado como resultado de un aumento en su proliferación local y a un aumento de la inmigración de los precursores de estas células debido a la influencia del tabaco.⁴⁰ Sin embargo, en otro estudio efectuado en biopsias de la mucosa oral de sujetos consumidores de tabaco masticado se identificó disminución del número de células de Langerhans en el sitio de contacto del tabaco en la mucosa oral.⁴¹ En mujeres adultas fumadoras, también se ha identificado una disminución en la densidad de células de Langerhans en el epitelio cervical normal comparadas con mujeres no fumadoras, dicha disminución se relacionó con el número de cigarros fumados.⁴²

En otro estudio en el que se expuso a un carcinógeno producto del tabaco, el benzopireno, las células de Langerhans epidérmicas disminuyeron en número y alteraron su función presentadora de antígeno con alteración de la respuesta inmune local.⁴³ Estudios realizados en piel de ratones, en los que se aplicó dimetilbenzantraceno (DMBA), una sustancia química carcinógena derivada del tabaco, se observó una disminución en el número y de la función de las células de Langerhans sin identificar el mecanismo de acción.⁴⁴ También en otro estudio en ratones, a los cuales se les aplicó sobre la piel humo de tabaco condensado, se observó un aumento en la cantidad de células de Langerhans y cambios en su morfología.⁴⁵

La evaluación cuantitativa y morfofuncional de las células dendríticas y las células de Langerhans en bronquiolos y parénquima pulmonar en fumadores de cigarrillos, se observó un incremento hasta del 140% en el número de células de Langerhans CD1a positivas, en este grupo.³⁰ En otro estudio realizado en sujetos voluntarios sanos fumadores y no fumadores a quienes se les realizó lavado bronquioalveolar para identificar la presencia de células de Langerhans (identificadas con histoquímica CD1a positivas y con microscopía electrónica de transmisión), se observó que el consumo de cigarrillos se asoció con un incremento de la población de células de Langerhans CD1a en el lavado bronquioalveolar, sin mencionar el mecanismo por el cual ocurrió.³¹

En un estudio realizado en niños no alérgicos candidatos a adenoamigdalectomía expuestos a humo de tabaco de forma pasiva y un grupo no expuesto, corroborado únicamente por cuestionario, se obtuvieron muestras de mucosa nasal mediante biopsia del cornete inferior. No existió diferencia entre los grupos en términos de números de células de Langerhans en el epitelio (127, 39-329 vs 127, 61-585) o lámina propia (12, 0-36 vs 10, 3-80) y tampoco hubo diferencias en el sitio de localización entre los dos grupos estudiados.²³

Finalmente, se ha reportado evidencia in vitro de que la nicotina es capaz de activar a las células dendríticas de humanos y murinos dosis dependiente, aumentando la capacidad de estas células para estimular la proliferación de células T y la secreción de citocinas.⁴⁶

JUSTIFICACIÓN

Las células de Langerhans son células presentadoras de antígenos que participan como la primera línea de defensa de la respuesta inmune local.⁴⁷ No está documentada la participación de las células de Langerhans en la vía aérea superior ante la participación del humo de tabaco y siendo controversial en otras regiones del cuerpo entre ellas mucosa nasal. La búsqueda intencionada de la literatura nacional e internacional no permite identificar estudios sobre el efecto del humo de tabaco en las células de Langerhans de la mucosa nasal de sujetos sin enfermedad nasal, únicamente en pulmón².

La evidencia sugiere que el humo de tabaco tiene un efecto en la cantidad de las células de Langerhans (CD1a+) del epitelio de bronquiolos y parénquima pulmonar.² Cabe mencionar que la vía respiratoria alta y baja, anatómica y fisiológicamente responde de manera diferente a los estímulos externos.³¹

Es importante identificar de primera intención si el humo de tabaco tiene efecto en la respuesta inmune local a través de conocer si se modifica la cantidad de células de Langerhans en la mucosa nasal de sujetos “sanos” y que nos permita tener como referencia a este grupo para estudiar el efecto del humo de tabaco en otro grupo de enfermedades como la rinitis alérgica, considerada una de las enfermedades más frecuentes a nivel mundial,⁴⁸ donde el humo de tabaco influye en la severidad nasal.⁴⁹

Por lo tanto, este estudio se planeó para identificar el posible efecto de la exposición del humo de tabaco de forma activa en la cantidad de las células de Langerhans CD1a + y Langerina + de la mucosa nasal de sujetos sin enfermedad nasal. Los resultados en este estudio podrían sugerir los mecanismos y repercusiones de efecto del humo de tabaco en la mucosa nasal.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la diferencia en la cantidad de las células de Langerhans CD1a+ y Langerina+ en la mucosa nasal de sujetos sin enfermedad nasal, expuestos (fumador activo) y no expuestos de forma habitual a humo de tabaco?

OBJETIVO

Identificar y comparar la cantidad de células de Langerhans CD1a+ y Langerina + en la mucosa nasal de sujetos sin enfermedad nasal, expuestos (fumador activo) y no expuestos de forma habitual a humo de tabaco.

HIPÓTESIS

La cantidad de las células de Langerhans CD1a+ y Langerina + en la mucosa nasal de sujetos sin enfermedad nasal, es mayor al 70%* en expuestos (fumador activo) que en los no expuestos de forma habitual a humo de tabaco.

*En el único estudio similar,³⁰ se identificó una diferencia de 140% en parénquima pulmonar en los expuestos a tabaco. Por no existir un antecedente adecuado para mucosa nasal de sujetos sin enfermedad nasal, los investigadores proponen un compromiso más conservador del 70%.

TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO

- Básico, transversal analítico.

VARIABLES

VARIABLE INDEPENDIENTE

- Exposición habitual a humo de tabaco (fumador activo).

Definición conceptual. Individuo que se encuentra en un ambiente con productos de la combustión del tabaco. En forma activa, cuando fuma más de 5 cigarrillos diarios o ha fumado más de 100 cigarros en la vida.^{32,33}

Definición operacional. Para este estudio, se aplicará el cuestionario de la Encuesta Nacional de Adicciones³³ para identificar las características de la exposición a humo de tabaco (activa) (anexo 1). También se efectuará la determinación de la concentración de cotinina en orina en ng/ml ajustado a la concentración de creatinina (anexo 2 y 3). A todos los sujetos se les solicitará muestra de orina al ingreso del estudio y dentro de las 24 horas (ver procedimientos).

Indicadores. Respuestas al cuestionario sobre consumo de tabaco³³ y medición de la concentración de cotinina en orina por cromatografía líquida de alta presión y la concentración de creatinina por cromatografía de gases (anexo 2 y 3). Los sujetos se considerarán como expuestos activos cuando refieran por cuestionario un consumo de más de 5 cigarrillos diarios y cuando la concentración de cotinina en orina sea > 6 ng/ml.

Escala de medición. Dicotómica, expuesto (activo) o no expuesto.

Unidad de Medición. Presencia o ausencia.

VARIABLE DEPENDIENTE

- Cantidad de células de Langerhans CD1a+ y langerina+.

Definición conceptual. Cantidad, cierto número de unidades;⁵⁰ las células de Langerhans son células dendríticas inmaduras que se encuentran en piel y mucosas y que característicamente presentan gránulos de Birbeck y por inmunohistoquímica CD1a+ y Langerina+.⁵¹

Definición operacional. Se identificará la presencia de las células de Langerhans por inmunohistoquímica en cortes histológicos de biopsia de la mucosa nasal. Dos observadores contarán las células CD1a+ por inmunohistoquímica (MCA 1657T, anti-human CD1a, Serotec Immunological Excellence, Oxford UK) y langerina +/CD207

(AF2088, anti-human Langerin/CD207, R&D Systems, Minneapolis, USA), que se identifiquen en cada mm² de muestra del epitelio y lamina propia de la mucosa del cornete inferior, y se observen con el objetivo de 40x con microscopio de luz (Olympus, CX21FS1, Tokio).

Indicadores: Conteo de células CD1a y langerina-positivas y lugar en donde se encuentran: epitelio y/o lámina propia.

Escala de medición: Cantidad (cuantitativa discreta) y Localización (nominal)

Unidad de medición. Cantidad de células por mm² y epitelio y/o lámina propia.

VARIABLE DE CONFUSIÓN

- Contaminación ambiental.

Definición conceptual. Se llama contaminación ambiental a la transmisión y difusión de humos o gases tóxicos a la atmósfera y el agua, así como también la presencia de polvos y gérmenes microbianos provenientes de los desechos de la actividad del ser humano.^{52,}

53

Definición operacional. La presencia de gases y partículas suspendidas que correspondan a la zona donde habitan los sujetos en estudio, de acuerdo con las determinaciones regionales del monitoreo del Índice Metropolitano de la Calidad del Aire (IMECA), a través del Sistema de Monitoreo Atmosférico de la Ciudad de México (SIMAT); para ozono (O₃), óxidos de nitrógeno (NO₂, NO_x y NO), dióxido de azufre (SO₂), monóxido de carbono (CO), partículas menores a 10 micrómetros (PM₁₀) y partículas menores a 2.5 micrómetros (PM_{2.5}).

Escala de medición. Cuantitativa continua con fin descriptivo y dicotómica para identificar su relación con la norma de calidad de aire para cada uno de los contaminantes.

Unidad de medición. Cantidad para ozono (O₃) en partículas por millón (ppm), óxidos de nitrógeno (NO₂, NO_x y NO) (ppm), dióxido de azufre (SO₂) (ppm), monóxido de carbono (CO) (ppm), partículas menores a 10 micrómetros (PM₁₀)(µg/m³) y partículas menores a 2.5 micrómetros (PM_{2.5})(µg/m³). La información se utilizará para describir la exposición como apoyo a la interpretación de los resultados del estudio.

VARIABLES DEMOGRÁFICAS

Edad

Definición Conceptual. Tiempo que ha vivido una persona.⁵⁰

Definición operacional. Se tomará en cuenta de acuerdo con la fecha de nacimiento.

Indicadores. Se expresará en años.

Escala de medición: Cuantitativa continua.

Sexo

Definición Conceptual. Condición orgánica, masculina o femenina.⁵⁰

Definición operacional. La que se observe según las características fenotípicas del paciente.

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

Escala de medición: Cualitativa dicotómica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Por muestreo consecutivo se captaron 29 sujetos sin enfermedad nasal, médicos residentes voluntarios de la Unidad Médica de Alta Especialidad "Gaudencio González Garza" del Centro Médico La Raza que reunieron los siguientes criterios de selección: Se incluyeron sujetos mayores de 18 años, médicos residentes, de sexo masculino o femenino, que fueran habitantes de la Zona metropolitana del Valle de México y que aceptaron participar en el estudio con firma de carta de consentimiento informado. No se incluyeron pacientes con poliposis nasal coexistente, con evidencia de otras enfermedades congénitas o adquiridas que afecten la nariz o senos paranasales (deformidad rinoseptal, rinitis vasomotora, etc.), con enfermedad rinosinusal concomitante, quienes padecían rinitis alérgica, asma, diabetes, alteraciones sanguíneas o renales, pacientes que ya habían recibido tratamiento médico durante las 4 semanas previas al estudio como esteroides, antihistamínicos, antiinflamatorios, antileucotrienos, cromoglicato o inmunoterapia, pacientes con embarazo o su diagnóstico durante el estudio. Durante el estudio se eliminaron pacientes que por cualquier motivo no

completaron el protocolo propuesto, o cuando la muestra fue insuficiente o inadecuado procesamiento de la muestra con la técnica de microscopio de luz.

Descripción General del Estudio

Se realizó la captación de sujetos por dos médicos residentes del Servicio de Otorrinolaringología (UMAЕ GGG CMN La Raza), quienes invitaron a participar a médicos residentes voluntarios sin enfermedad nasal y que aceptaron participar con firma de carta de consentimiento informado. Las actividades que se desarrollaron en el estudio se describen a continuación y los procedimientos en el apartado correspondiente. Se les realizó una historia clínica a todos los participantes por los médicos colaboradores. Se identificó la exposición habitual o no a humo de tabaco, a través de la Encuesta Nacional de Adicciones³³ y con la cuantificación de cotinina en orina ajustada a la concentración de creatinina en el laboratorio clínico (UMAЕ GGG CMN La Raza). Se obtuvo una muestra de orina al inicio del estudio y a las 24 hrs. para la determinación de cotinina. Posteriormente se realizó biopsia de la mucosa nasal del cornete inferior realizada por dos médicos del Servicio de Otorrinolaringología, la muestra se colocó en formaldehído al 4% hasta su procesamiento para la técnica de microscopía de luz. Una vez que se completó la captación de pacientes, las muestras se almacenaron en la Unidad de Investigación (UMAЕ GGG CMN La Raza) y se procesaron por la química que participó en el estudio. Las mediciones y/o lectura de las laminillas con inmunohistoquímica para identificar la presencia de células de Langerhans CD1a+ y Langerina+ en la mucosa nasal, se realizaron por el experto colaborador. Antes de realizar el estudio se procedió al ajuste de los procedimientos y de las técnicas de laboratorio. Durante el desarrollo de este estudio, se realizó el monitoreo del registro del Índice Metropolitano de la Calidad del Aire (IMECA) que se reporta por la Secretaría del Medio Ambiente (www.sma.df.gob.mx) para ozono (O₃), óxidos de nitrógeno (NO₂, NO_x y NO), dióxido de azufre (SO₂), monóxido de carbono (CO), partículas menores a 10 micrómetros (PM₁₀) y partículas menores a 2.5 micrómetros (PM_{2.5}) a través del Sistema de Monitoreo Atmosférico de la Ciudad de México (SIMAT) de las estaciones de la Red Automática de Monitoreo Atmosférico (RAMA) que correspondan a la Zona Metropolitana del Valle de México, no se reportaron contingencias durante el año en curso.

Ajuste de procedimientos y técnicas de laboratorio

Las técnicas de laboratorio se estandarizaron con muestras obtenidas de sujetos voluntarios ajenos al estudio (grupo de investigadores) que participan en el estudio.

Procedimientos

Administración de cuestionario

El cuestionario de Tabaco de la Encuesta Nacional de Adicciones.³³ Para este estudio se aplicaron las 15 preguntas que identifican el consumo de tabaco, mediante autoadministración. En México, incluyendo el Instituto Mexicano del Seguro Social, ya se ha administrado.⁵⁴⁻⁵⁶

Determinación de Cotinina en orina

La muestra de orina se obtuvo instruyendo al paciente que coloque en el frasco estéril que se le proporcione al menos 20 ml. Las muestras congeladas, se descongelaron para la determinación de cotinina en orina ajustada a la concentración de creatinina en 10 a 15 ml de la misma. Se procesaron en bloques con técnica de HPLC, previa calibración, en el cromatógrafo líquido de alta presión (9050, Varian, Texas) y la creatinina con el cromatógrafo de gases (ILab 600, Instrumentation Laboratory, UK) (Anexo 2 y 3). Los resultados se registraron en ng/ml.

Biopsia nasal

Después de anestesia local colocando un algodón con xilocaína a 1% con epinefrina (1:1000) debajo del extremo caudal del cornete inferior, sin tocar el sitio de toma de la muestra, se obtuvo la biopsia de la mucosa del borde caudal del cornete inferior a 2 cm posterior a la cabeza del cornete, con una pinza de Gerritsma cuyo diámetro de copa es de 2.5 mm.⁵⁷

Inmunohistoquímica CD1a y Langerina.

Después de obtener la biopsia, se colocó en formaldehído al 4% con PBS (buffer salino de fosfatos) por un mínimo por 12 h, luego se realizó la inclusión y corte en parafina. Los cortes, de 3 micrómetros de grosor, se colocaron en portaobjetos cargados positivamente (superfrost plus). Se desparafinaron en horno seco a 55 C durante 30 min y luego 60 min en xilol absoluto. Posteriormente se rehidrataron por pasos secuenciales de etanol al 90%, 60%, 50% y agua destilada. Se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 1% en metanol durante 10 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego de lavar las preparaciones tres veces con PBS 0.1M (pH 7.2) durante 5 minutos, se realizó la recuperación del antígeno incubando los cortes en un amortiguador de citrato de sodio (pH 9) en vaso de Coplin y sometiéndolos a 90 °C dentro de una olla de presión. Después de que se dejaron enfriar, se lavaron 3 veces en PBS y se bloquean sitios de unión inespecífica de los anticuerpos, incubando en una solución de PBS-Albúmina sérica bovina (ASB) al 2%-Tritón X-100 al 0.01%, durante 1 h a TA. Sin lavar, los cortes fueron incubados en algunos de los siguientes anticuerpos primarios: anti CD1a (MCA 1657T, anti-human CD1a, Serotec Immunological Excellence) y anti langerina /CD207 (AF2088, anti-human Langerin/CD207, R&D Systems, Minneapolis, USA) en cámara húmeda durante la noche a 4 °C, sin diluir (de acuerdo al instructivo). Después se lavaron 3 veces de 5 min cada una en PBS con ASB al 0.1% para incubar en el anticuerpo secundario biotinilado (gota anti-mouse IgG), durante 1 h a TA, en cámara húmeda, de acuerdo con las instrucciones del kit (Zymed Laboratories, Inc). Finalmente, la inmunohistoquímica fue revelada al incubar con el complejo estreptavidina-peroxidasa-cromógeno, preparado de acuerdo con instructivo de proveedor (Dako, Inc) y después de lavar las preparaciones tres veces con PBS 0.1M (pH 7.2) durante 5 minutos y luego con agua de grifo, fueron deshidratadas con etanol 95% - xilol con tres cambios de 5 minutos cada uno, y contrastadas con hematoxilina de Harris y se montaron con resina permount.

Cuantificación de células de Langerhans CD1a+ y langerina+.

Las células CD1a+ y langerina+ fueron aquellas que tuvieron citoplasma de color café intenso y núcleo contrateñido claramente visible. El número de células positivas fue determinado en forma separada por dos evaluadores independientes. Las células CD1a+ y langerina+ intraepiteliales y de la lámina propia fueron contadas con el objetivo 40X y cámara lúcida. El número de campos a evaluar para cada sujeto fueron de 10 a 12 de

acuerdo a la calibración que se haga en el microscopio y el número de CL CD1a+ y Langerina + fueron expresado como células de Langerhans por mm² de superficie de corte del epitelio y/o de la lámina propia.

Procesamiento de datos

Los resultados de cada una de las determinaciones se registraron en la hoja de recolección de datos (anexo 6) y luego se concentraron en una hoja de cálculo (Excel 2000, Microsoft, Palo Alto) para efectuar su análisis estadístico (CSS, Statsof, Tulsa).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se compararon con la prueba de Kolmogorov Smirnov y de acuerdo a los resultados se utilizó estadística descriptiva con medidas de tendencia central y de dispersión paramétrica o no paramétrica. El análisis inferencial se realizó de acuerdo a la distribución de los datos para comparar la cantidad de células de Langerhans en los dos grupos con t de student para muestras independientes, U de Mann Whitney, y en su caso regresión logística, se consideró como significativa una $p < 0.05$. Tamaño de muestra. El cálculo del tamaño de la muestra para iniciar el estudio, se efectuó con la fórmula para calcular el tamaño de la muestra para estimar la diferencia entre dos medias, con un alfa de 0.05, una potencia del 80% y una diferencia del 70%³⁰ para la cantidad de células de Langerhans por mm². Total 34 sujetos, 17 expuestos y 17 no expuestos a humo de tabaco.

CONSIDERACIONES ETICAS

El proyecto de investigación con número de registro: R- 2006-3502-62, se sometió para ser evaluado por el Comité Local de Investigación en Salud del IMSS, UMAE "GGG" Centro Médico Nacional La Raza. La propuesta y la ejecución del estudio se efectuó respetando los artículos 96 al 103, capítulo único del Título Quinto de la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos en materia de Investigación para la Salud y las Normas del Instituto Mexicano del Seguro Social. No viola ninguno de los principios básicos para la investigación en seres humanos, establecidos por la declaración de la Asamblea Mundial del Tratado de Helsinki, Finlandia, ni sus revisiones de Tokio, Hong-Kong, Venecia y Edimburgo.

Se obtuvo la autorización de los participantes para ser incluidos en el estudio por escrito y con lenguaje entendible por los médicos residentes colaboradores de este estudio. El estudio se realizó por personal capacitado y con la participación de médicos. La obtención de una muestra de la mucosa nasal con biopsia, no ha mostrado la presencia de sangrado. En un estudio realizado con biopsias obtenidas de la mucosa nasal con la misma técnica que realizamos en este estudio,⁵⁷ en 63 sujetos a los que se les realizó en una sola ocasión una biopsia, no se observó sangrado. Cuando se realizó a 29 sujetos de dos hasta cinco biopsias al mismo sujeto, únicamente un sujeto presentó epistaxis (3%), que fue controlado con medidas convencionales. Cabe mencionar que en este estudio únicamente se obtuvo una biopsia de la mucosa nasal en cada sujeto, sin embargo, aunque la posibilidad de sangrado es nula, se consideró el riesgo de sangrado y se realizaron las medidas necesarias para evitar su presencia y en su caso el control de la misma. Los riesgos, molestias e inconvenientes se mencionan en la carta de consentimiento informado. De acuerdo con la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos en materia de Investigación para la Salud, Artículo 17, este estudio representa un riesgo mayor al mínimo para el sujeto.

RESULTADOS

En nuestro estudio se incluyeron 29 sujetos, la mayoría médicos residentes de la especialidad de otorrinolaringología, de los cuales 14 (48.2%) fueron de sexo masculino y 15 (51.8%) femenino. Con respecto al resto de las características basales no hubo diferencias estadísticamente significativas.

Entre los sujetos con exposición a humo de tabaco 20 fueron fumadores activos y uno pasivo en los últimos dos días, 13 no fueron expuestos a humo de tabaco.

Con respecto a la frecuencia y severidad de los síntomas no hubo diferencias entre los dos grupos. En el grupo de fumadores el síntomas más frecuente fue la rinorrea.

TABLA 1

Categoría	Expuestos a tabaco Promedio (DE) n= 16	No expuestos a tabaco n= 13	Total n= 29
Edad (DS)	27 (3.75)	27.56 (7.24)	27.68 (3.74)
Genero			
Masculino (%)	11(69%)	3 (23%)	14 (48.2%)
Femenino (%)	5 (31%)	10 (77%)	15 (51.8%)
Talla (DE)	1.71 (0.08)	1.54 (0.39)	1.67(0.098)
Peso (DE)	76.21(11.15)	60.39 (16.72)	69.87(12.88)
IMC (DE)	25.78 (2.60)	22.29 (5.92)	24.72 (2.98)
ALERGIAS (polvo, gatos, capriola, heno)	3 (19%)	1 (8%)	4 (13.7)
Alcoholismo	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Cotina (DE)	1349.92 (1702.5)	199.75 (521.8)	
Rel cot/creat	1071.75 (1481.8)	169.87(438.5)	596.3 (1210)

Resultados de las células de langerhans

En los cortes de tejido de las biopsias de mucosa nasal de 2 mm identificamos integridad del epitelio y la lámina propia, no se identificó la presencia de células de langerhans CD1a+ y Langerina+ en la mucosa nasal con inmunohistoquímica, tanto en el grupo de fumadores con los no fumadores.

DISCUSIÓN

El objetivo del estudio fue Identificar y comparar la cantidad de células de Langerhans CD1a+ y Langerina+ en la mucosa nasal de sujetos sin enfermedad nasal, expuestos (fumador activo) y no expuestos de forma habitual a humo de tabaco.

En este estudio no se identificó o fue casi nula la presencia de células de Langerhans en la mucosa nasal de sujetos sanos, nosotros esperábamos identificar una mayor cantidad de células de Langerhans, ya que estudios realizados en la mucosa bronquial han encontrado la presencia de estas células.²⁹⁻³¹ Como lo comentado por Tazi, A J Hance, et al., donde demostraron que las células de langerhans CD1a-/CD1c+ están presentes tanto en la submucosa bronquiolar como en el parénquima alveolar del pulmón sano, mientras que las células CD1a+ se encuentran preferentemente dentro del epitelio bronquiolar.²⁹

En algunos estudios revisados en la literatura se encontró que existen pocas células de Langerhans en biopsias tomadas de mucosa nasal en pacientes sanos comparados con pacientes con algún tipo de alergia.^{25,26} Tal es el caso del estudio realizado Fokkens W, Vroom T, Rijntjes E, et al., donde analizaron 12 sujetos con promedio de edad de 28 años sanos y con pruebas de alergia negativa, encontrando que el promedio de células CD1a+ por milímetro cuadrado en el epitelio fue de 20 (D.E. 14.1) y en la lámina propia de 4 (4), comparado con 11 pacientes con algun grado de atopia donde en el epitelio fueron 55 (49.5) y en la lámina propia 12 (de 22).²⁵ En la rinitis alérgica las células CD1a+ presumiblemente células de Langerhans, han demostrado que desempeñan un papel en la presentación de los alérgenos, debido a esto sigue siendo una cuestión interesante si estas células son constitutivamente más numerosas en la mucosa nasal de los pacientes con rinitis alérgica o si migran al epitelio durante la exposición.²⁵

En base a estos resultados nos planteamos el motivo por el cual no identificamos un aumento en el número de éstas células de Langerhans en la mucosa nasal, ya que la mayoría no presentaba ninguna patología de tipo alérgica y por lo tanto, no se logró identificar si la exposición al humo de tabaco disminuía o aumentaba aun más la expresión de este tipo de células.

La detección de células de Langerhans CD1a+ y Langerina+ al realizar inmunohistoquímica de las biopsias realizadas en mucosa nasal fue negativa tanto para el grupo de fumadores como los no fumadores, sin embargo, en la revisión de la literatura no esta documentado aún el efecto que tiene el tabaco en la presencia de células de Langerhans en la vía aérea superior, en comparación con la presencia de dichas células en el tracto respiratorio inferior de pacientes fumadores, donde es cierto, que existe evidencia que el humo de tabaco ejerce un efecto en la cantidad de células de Langerhans del epitelio pulmonar y bronquial. En un estudio publicado por Soler P, Moreau A, et al., hicieron una evaluación cuantitativa y morfofuncional de las células dendríticas y las células de Langerhans en bronquiolos y parénquima pulmonar en fumadores, donde observaron un incremento del 140% en el número de células de Langerhans CD1a+, en este grupo.³⁰

Este estudio nos cuestiona sobre si la cantidad de células de Langerhans se modificaría en pacientes con alguna patología nasal, poniendo como principal referencia a la rinitis alérgica, comparado con pacientes sanos e investigar los efectos del tabaquismo, el cual agravaría la sintomatología nasosinusal y por lo consiguiente el reclutamiento de células de Langerhans en la mucosa nasal.

Con base a lo antes mencionado surgiría una nueva hipótesis sobre la participación de las células de Langerhans en la fisiopatología de la rinitis alérgica al comparar sujetos sanos y pacientes con rinitis alérgica para identificar la disminución de estas células en la vía aérea superior y como el tabaco podría afectar su expresión.

CONCLUSIÓN

En este estudio no se identificaron células de Langerhans CD1a+ y Langerina+ en la mucosa nasal de sujetos sanos, de igual manera, no se demostró algún efecto ante la exposición al humo de tabaco en la cantidad de dichas células en la mucosa nasal en sujetos sanos. La cantidad de células de Langerhans en la vía superior es menor a lo identificado en la vía aérea inferior de sujetos sanos, aún no se ha documentado el efecto del tabaco en las células de Langerhans en la vía respiratoria superior. Es deseable buscar en otras enfermedades nasosinusales como la rinitis alérgica si se estimula el reclutamiento de estas células ante la exposición al humo de tabaco.

BIBLIOGRAFÍA

1. Iglesias M. Las células dendríticas y su papel de centinelas del sistema inmune. *Reumatología* 2003;19:168-9.
2. Cavanagh I, Von Andrian U. Travellers in many guises: the origins and destinations of dendritic cells. *Immunology and Cell Biology* 2002;80:448-62.
3. Hartgers F, Figdor C, Adema G. Towards a molecular understanding of dendritic cell immunobiology. *Immunology Today* 2000; 21:542-5.
4. Goldschneider I, Cone R. A central role for peripheral dendritic cells in the induction of acquired thymic tolerance. *Trends Immunology* 2003;24:77-81.
5. Birbeck M, Breathnach A, Everall J. An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol* 1961;37:51-64.
6. Banchereau J, Caux C, Davoust J, Saeland S The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of Langerhans cells, and is rapidly internalized from the cell surface. *Eur J Immunol* 1999;29:2695-704.
7. Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 2000;12:71-81.
8. Parra E, Sánchez L, Castro E, Barbosa G, Ruíz A, Aragón M. Histiocitosis de células de Langerhans (histiocitosis X), en el tracto genital femenino, presentación de 3 casos y revisión de la literatura. *Rev Colomb Obstet Ginecol* 1999;50:151-156.
9. Liu H, Schroeter A, Muller S. OKT-6 is not superior to HLA-DR or ATPase as a marker for Langerhans cells in normal human epidermis. *Clin Exp Dermatol* 1986;11:229-37.
10. Schmitt D, Dezutter-Dambuyant C, Brochier J, Thivolet J. Subclustering of CD1 monoclonal antibodies based on the reactivity on human Langerhans cells. *Immunol Letters* 1986;12:231-5.
11. Porcelli S, Modlin R. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol* 1999;17:297-329.

12. Romani N, Schuler G, Fritsch P. Identification and phenotype of epidermal Langerhans cells. In: Schuler G (Ed). Epidermal Langerhans cells. Boca Ratón. CRC Press,1991.
13. De la Salle C, Esposito-Farece M, Bieber T, Moncuit J, Morales M, Wollenberg A. Release of soluble Fc gamma RII (CD32 molecules by human Langerhans cells: a subtle balance between shedding and secretion? J Invest Dermatol 1992; 99:15S-7S.
14. Bierber T, de la Salle H, de la Salle C, Hanau D, Wollenberg A. Expression of high affinity receptor for IgE (Fcε-RI) on human Langerhans cells: The end of a dogma. J Invest Dermatol 1992;92:10S-11S.
15. Rieger A, Binghe W, Kilgus O, Ochiai K, Mauerer D, Fodinger D. Fc epsilon RI mediates IgE binding to Langerhans cells. J Invest Dermatol 1992;99:30S-2S.
16. Kashihara M, Ueda M, Horiguchi Y, Furukawa F, Hanaoka M, Imamura S. A monoclonal antibody specifically reactive to human Langerhans cells. J Invest Dermatol. 1986;87:602-7.
17. Rizova H, Carayon P, Barbier A, Lacheretz F, Dubertret L, Michel L. Contac allergens but not irritants, after receptor-mediated endocytosis by human epidermal Langerhans cell. British J Dermatol 1999;140:200-9.
18. Breathnach A. Observations on cytoplasmic organelles in Langerhans cells in human epidermis. J Anat 1964; 98:265-70.
19. Bryant N. Laboratory immunology and serology. 3a ed. EU: W.B. Saunders Company; 1992.
20. Fraissinette A, Schimitt S, Thivolet J. Langerhans cells of human mucosa. J Dermatol 1989;16:255-62.
21. Hellquist H, Olsen K, Irander K, Karlsson E, Ödkvist L. Langerhans cells and subsets of lymphocytes in the nasal mucosa. APMIS 1991;99:449-54.
22. Vinke J, KleinJan A, Severijnen L, Hoeve L, Fokkens W. Differences in nasal cellular infiltrates between allergic children and age-matched controls. Eur Respir J 1999;13:797-803.
23. Vinke J, Kleinjan A, Severijnen L, Fokkens W. Passive smoking causes an allergic cell infiltrate in the nasal mucosa of non-atopic children. Int J Pediatric Otorhinolaryngology 1999; 51:73-81.
24. Fokkens W, Broekhuis-Fluttsma M, Rijntjes E, Vroom T, Hoefsmit E. Langerhans cells in nasal mucosa of patients with grass pollen allergy. Immunobiol 1991;182:135-42.

25. Fokkens W, Vroom T, Rijntjes E, Mulder P. Fluctuation of the number of CD-1(T6)-positive dendritic cells, presumably Langerhans cells, in the nasal mucosa of patients with an isolated grass-pollen allergy before, during, and after the grass-pollen season. *J Allergy Clin Immunol.* 1989;84:39-43.
26. Fokkens W, Vroom T, Rijntjes E, Mulder P. CD1 (T6), HLA-DR-expressing cells, presumably Langerhans cells, in nasal mucosa. *Allergy* 1989;44:167-72.
27. Depuydt P, Lambrecht B, Joos G, Pauwels R. Effect of ozone exposure on allergic sensitization and airway inflammation induced by dendritic cells. *Clin Exp Allergy* 2002;23:391-6.
28. Koike E, Kobayashi T. Ozone exposure enhances antigen-presenting activity of interstitial lung cells in rats. *Toxicology* 2004;196:217-27.
29. Tazi A, Bouchonnet F, Grandsaigne M, Boumsell L, Hance AJ, Soler P. Evidence that granulocyte macrophage-colony-stimulating factor regulates the distribution and differentiated state of dendritic cells/Langerhans cells in human lung and lung cancers. *J Clin Invest* 1993;91:566-76.
30. Soler P, Moreau A, Basset F, Hance A. Cigarette smoking-induced changes in the number and differentiated state of pulmonary dendritic cells/ Langerhans cells. *Am Rev Resp Disease* 1989;139:1112-7.
31. Casolaro M, Bernaudin J, Saltini C, Ferrans V, Cristal R. Accumulation of Langerhans Cells on the epithelial surface of the lower respiratory tract in normal subjects in association with cigarette smoking. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:406-11.
32. World Health Organization. The smoking epidemic "a fire in the global village". 25th August Ginebra:1997, Press Release WHO761.
33. Secretaria de Salud. Dirección general de Epidemiología. Encuesta Nacional de Adicciones; 2002 (ENA-2002). México 2002.
34. Valdés R, Meneses F, Lazcano E, Hernández M, Hernández M. Encuesta sobre Tabaquismo en Jóvenes, México 2003. Cuernavaca: Instituto Nacional de Salud Pública, 2004.
35. Benowitz N, Kuyt F, Jacob P, Jones R, Osman A. Cotinine disposition and effects. *Clin Pharmacol Ther* 1983;34:604-11.
36. 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;62:459-66.

37. Thompson S, Stone R, Nanchahal K, Wald N. Relation of urinary cotinine concentrations to cigarette smoking and to exposure to other people's smoke. *Thorax* 1990;45:356-61
38. Bergmann K. Effect of smoking on immune function. *Allergie und Immunologie* 1980;26:3-14.
39. Taylor R, Gross E, Joyce H, Holland F, Pride N. Smoking, allergy, and the differential white blood cell count. *Thorax* 1985;40:17-22.
40. Barrett A, Williams D, Scott J. Effect of tobacco and alcohol consumption on the Langerhans cell population of human lingual epithelium determined using a monoclonal antibody against HLADR. *J Oral Pathol Med* 1991;20:49-52.
41. Daniels T, Chou L, Greenspan J, Grady D, Hauck W, Greene J, et al. Reduction of Langerhans cells in smokeless tobacco-associated oral mucosal lesions. *J Oral Pathol Med* 1992;21:100-4.
42. Barton S, Maddox P, Jenkins J, Edwards R, Cuzick J, Singer A. Effect of smoking on cervical epithelial immunity: a mechanism for neoplastic change? *Lancet* 1988;2:652-4.
43. Muller H, Dandie G, Ragg S, Woods G. Langerhans cell alterations in cutaneous carcinogenesis. *In Vivo*. 1993;7:293-6.
44. Woods G, Qu M, Ragg S, Muller H. Chemical carcinogens and antigens induce immune suppression via Langerhans' cell depletion. *Immunology*.1996;88:134-9.
45. Zeid N, Muller H. Tobacco smoke condensate cutaneous carcinogenesis: change in Langerhans cells and tumor regression. *Int J Exp Pathol*.1995;76:75-83.
46. Aicher A, Heeschen C, Mohaupt M. Nicotine strongly activates dendritic cell-mediated adaptive immunity: potential role for progression of atherosclerotic lesions. *Circulation* 2003;107:604-11.
47. Hachisuga T, Fukuda K, Kawarabayashi T. Local Immune Response in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Obstet Invest* 2001;52:3-8.
48. Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N; Aria Workshop Group; World Health Organization Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:S147-334.
49. Gold D. Environmental tobacco smoke, indoor allergens, and childhood asthma. *Environ Health Perspect* 2000;108:S643-51.
50. *Diccionario de la Real Academia Española* 2001

51. Kohl K, Klein E, Koch S, Schnautz S, Bieber T. Migration and differentiation of Langerhans cell precursors. *Eur J Cell Biol.* 2004;83:805-11.
52. Gobierno del Distrito Federal, Secretaría del Medio Ambiente, Sistema de Monitoreo Atmosférico de la Ciudad de México (SIMAT), 2006.
53. Gobierno del Distrito Federal, Secretaría del Medio Ambiente, Sistema de Monitoreo Atmosférico de la Ciudad de México (SIMAT), 2004.
54. Fernández I Escobedo J, Hernández D. Tobacco consumption among the active insured population of the Mexican Social Security Institute. *Salud Pública Mex* 1997;39:125-32.
55. Tapia R, Cravioto P, De la Rosa B, Galván F, García-de la Torre G, Kuri P. Tabaquismo: conocimientos y actitudes de médicos mexicanos. *Salud Publica Mex* 1997;39:507-12.
56. Tapia R, Kuri P, Hoy M. Panorama epidemiológico del tabaquismo en México. *Salud Pública Mex* 2001;43:478-84.
57. Fokkens W, Rijntjes E, Vroom T, Gerritsma V. A mild biopsy method to obtain high-quality specimens of nasal mucosa. *Rhinology* 1988; 26:293-5.

ANEXOS.

CUESTIONARIO SOBRE CONSUMO DE TABACO

TABACO		
<p>1. ¿Ha fumado <i>tabaco</i> alguna vez en su vida?</p> <p>① Si → Pase a preg. 2 ② No → Salte a preg. 15</p>	<input type="checkbox"/>	
<p>2. ¿Cuántos años tenía cuando fumó <i>tabaco</i> o cigarrillos por primera vez?</p> <p>↓ Edad _____</p>	<input type="checkbox"/>	
<p>3. En toda su vida ¿Ha fumado más de 100 cigarros, es decir, 5 cajetillas?</p> <p>↓ ① Si ② No</p>	<input type="checkbox"/>	
<p>4. En los últimos 12 meses, ¿Ha fumado <i>tabaco</i>?</p> <p>① Si → Pase a preg. 5 ② No → Salte a preg. 14</p>	<input type="checkbox"/>	
<p>5. En los últimos 30 días, ¿Ha fumado <i>tabaco</i>?</p> <p>① Si → Pase a preg. 6 ② No → Salte a preg. 8</p>	<input type="checkbox"/>	
<p>6. Aproximadamente, ¿Cuántos cigarrillos ha fumado diariamente en los últimos 30 días?</p> <p>↓ ① No fuma diario ② De 1 a 5 ③ De 6 a 10 ④ De 11 a 20 ⑤ Más de 20</p>	<input type="checkbox"/>	
<p>7. ¿Cuánto tiempo después de despertarse fuma su primer cigarro? (Marque una sola opción)</p> <p>↓ ① Los primeros 5 minutos ② Entre 5 y 30 minutos ③ Entre 31 y 60 minutos ④ Más de 1 hora</p>	<input type="checkbox"/>	
<p>8. ¿Cuántos años tenía cuando comenzó a fumar <i>tabaco</i> diariamente?</p> <p>↓ ① Edad _____ ② Nunca ha fumado a diario</p>	<input type="checkbox"/>	
<p>9. ¿Fuma usted más durante las primeras horas del día que durante el resto del día?</p> <p>① Si ② No } Pase a preg. 10 ③ Ya no fuma → Salte a preg. 14</p>	<input type="checkbox"/>	
<p>10. ¿Sería difícil para usted abstenerse de fumar en lugares donde está prohibido? (Iglesias, bibliotecas, cines, secciones de no fumar en restaurantes u oficinas)</p> <p>↓ ① Si ② No</p>	<input type="checkbox"/>	
<p>11. De los cigarros que fuma durante el día ¿Cuál sería el más difícil de dejar para usted? (Marque una sola opción)</p> <p>↓ ① El primero de la mañana ② El de después de comer ③ Cuando está bajo tensión ④ El del baño ⑤ El de antes de dormir ⑥ Algún otro ⑦ Todos</p>	<input type="checkbox"/>	
<p>12. Cuando se enferma y tiene que permanecer en cama ¿Usted fuma?</p> <p>↓ ① Si ② No</p>	<input type="checkbox"/>	
<p>13. ¿Alguna vez ha intentado dejar de fumar?</p> <p>① Si } Salte a preg. 15 ② No</p>	<input type="checkbox"/>	
<p>14. ¿Hace cuánto tiempo dejó de fumar?</p> <p>↓ _____ años Meses</p>	<input type="checkbox"/>	
<p>15. De las personas que viven con usted, ¿Cuántos de ellos fuman? (Dé su mejor aproximación)</p> <p>↓ _____ Núm. de personas</p>	<input type="checkbox"/>	

CREATININA EN ORINA

Se obtendrá orina una muestra de orina de 15 ml que se recolectará en un recipiente de boca ancha y estéril de 150 ml (Corning). Durante la recolección de la muestra se deberá desechar el primer chorro de la micción e inmediatamente se depositará el resto en el contenedor proporcionado. Luego se colocarán 10 ml de esta muestra en un tubo de ensayo de vidrio y se centrifugará a 2000 rpm durante 15 minutos, alicuotar el sobrenadante en tubos de Ependorf de 2 ml (Axygen Quality). Las muestras se almacenarán a -20 ° C y se procesarán en bloque para su análisis. Para la determinación de creatinina en orina, las muestras se descongelarán a temperatura ambiente y homogeneizadas antes de su análisis. La determinación cuantitativa de creatinina en orina se realizará mediante la técnica de colorimetría con el analizador (ILab 600, Instrumentation Laboratory, UK) con el Kit Clinical Chemistry IL Test tm Creatinine, las mediciones se realizarán a una absorbancia de 510 nm. Los resultados se registrarán en mg/dl.

DETERMINACIÓN DE COTININA EN ORINA.

La muestra de orina se obtendrá instruyendo al paciente que coloque en el frasco estéril que se le proporcione al menos 20 ml. Las muestras congeladas, se descongelarán para la determinación de cotinina en orina en 10 a 15 ml de la misma. Se procesarán en bloques por técnica de HPLC, previa calibración, en el cromatógrafo líquido de alta presión (9050, Varian, Texas). Los resultados se registrarán en ng/ml.

La determinación de creatinina en orina se realizará con la técnica de cromatografía de gases.

CARTA DE CONSENTIMIENTO.

"EFECTO DE LA EXPOSICIÓN HABITUAL A HUMO DE TABACO (FUMADOR ACTIVO) EN LA CANTIDAD DE CÉLULAS DE LANGERHANS EN LA MUCOSA NASAL DE SUJETOS SIN ENFERMEDAD NASAL" HOSPITAL CENTRO MEDICO "LA RAZA".

Lugar y fecha _____.

Nombre: _____, por medio de la presente acepto participar, en el proyecto de investigación titulado "Efecto de la exposición habitual a humo de tabaco (fumador activo) en la cantidad de células de Langerhans en la mucosa nasal de sujetos sin enfermedad nasal" con número de registro _____ ante el Comité Local de Investigación en Salud, que tiene como objetivo identificar la cantidad de células llamadas Langerhans, que forman parte de los mecanismos de defensa en contra de sustancias que pueden ser dañinas y que se encuentran en el ambiente, como el tabaco.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en contestar las preguntas de un cuestionario y que revisen mi nariz, así como proporcionar dos muestras de mi orina y permitir que me efectúen una toma de muestra del recubrimiento interno de mi nariz de aproximadamente 2 x 2 mm, por un procedimiento de biopsia que se efectúa en el consultorio, después de la aplicación local de un anestésico (mediante un algodón y sin agujas), con una pinza especial con la que se toma la muestra mediante un "pellizco" en la mucosa de la nariz. Se me ha explicado que en un estudio en el que se obtuvieron muestras de la nariz con esta técnica, se observó que ninguno de 63 voluntarios tuvo sangrado cuando solo se tomo la muestra una vez, pero cuando se les tomaron más de dos muestras el sangrado se presento en cerca del 3%. Sin embargo, se ha considerado la posibilidad de que pueda ocurrir sangrado, por lo que se realizarán las medidas necesarias para evitarlo, como son el aplicar lubricar la nariz, así como en su caso cerrar los vasos con una sustancia (cauterizar) o colocar un tapón de gasa; también podría ocurrir dolor, para lo cual podrá administrarse un analgésico en caso necesario. Con respecto a los efectos de la anestesia local aunque son extremadamente raros pudiera ocurrir una reacción de su organismo a la anestesia que puede ser desde una reacción alérgica y reflejo vagal.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos como el sangrado de la nariz, molestias como el contestar un cuestionario y proporcionar dos muestras de orina y que no hay un beneficio derivado de mi participación en éste estudio, estaré pendiente y en contacto con el investigador Dra. B. Montaña V. (52784848 clave 5591159248) ante la presencia de cualquier molestia.

El investigador principal se ha comprometido a darme la información oportuna sobre cualquier procedimiento, para responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte mi desempeño, actividad o evaluación académica por parte del personal del Instituto.

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

Nombre y firma
del paciente

Dra. B. Beatriz Montaña Velázquez.
Investigador principal

Testigo

Testigo

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

Código:_____

Nombre:_____

No. Afiliación:_____

Edad:_____ (años)

Género:_____ (M=Masculino, F=Femenino)

Resultados del cuestionario ENA: exposición activa a humo de tabaco: Si___ No___

Cotina en orina > 6.0 ng/ml: Si___ No___

Cantidad de células de Langerhans por mm²;_____

Cantidad de células de Langerhans por mm² por localización: epitelio y lámina propia:_____