



TESIS DOCTORAL

**INMUNOLocalización DE LA SUSTANCIA P
Y EL RECEPTOR NEUROKININA 1 EN AMÍGDALAS PALATINAS
CON AMIGDALITIS RECURRENTES**

María José Reina Soto

Universidad de Sevilla

Facultad de Medicina, Departamento de Cirugía

Sevilla, 2019

**DR. D. MIGUEL MUÑOZ SÁEZ, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA,**

CERTIFICA:

- Que, bajo su dirección, la Licenciada en Medicina y Cirugía Dña. María José Reina Soto, ha realizado el trabajo titulado **“INMUNOLocalización de la sustancia P y el receptor neurokinina 1 en amígdalas palatinas con amigdalitis recurrentes”**.
- El trabajo reúne, en su criterio, todas las características exigibles desde el punto legal y científico para que con su defensa pueda alcanzar el título de Doctora por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 16 de septiembre de 2019



Fdo: Dr. D. Miguel Muñoz Sáez

**DR. D. JUAN SOLANELLAS SOLER, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA
POR LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,**

CERTIFICA:

- Que, bajo su dirección, la Licenciada en Medicina y Cirugía Dña. María José Reina Soto, ha realizado el trabajo titulado **“INMUNOLOCALIZACIÓN DE LA SUSTANCIA P Y EL RECEPTOR NEUROKININA 1 EN AMÍGDALAS PALATINAS CON AMIGDALITIS RECURRENTES”**.
- El trabajo reúne, en su criterio, todas las características exigibles desde el punto legal y científico para que con su defensa pueda alcanzar el título de Doctora por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 16 de septiembre de 2019



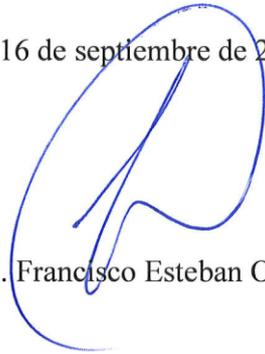
Fdo: Dr. D. Juan Solanellas Soler

DR. D. FRANCISCO ESTEBAN ORTEGA, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICA:

- Que, bajo su dirección, la Licenciada en Medicina y Cirugía Dña. María José Reina Soto, ha realizado el trabajo titulado **“INMUNOLOCALIZACIÓN DE LA SUSTANCIA P Y EL RECEPTOR NEUROKININA 1 EN AMÍGDALAS PALATINAS CON AMIGDALITIS RECURRENTE”**.
- El trabajo reúne, en su criterio, todas las características exigibles desde el punto legal y científico para que con su defensa pueda alcanzar el título de Doctora por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 16 de septiembre de 2019



Fdo: Dr. D. Francisco Esteban Ortega

**DÑA. MARÍA JOSÉ REINA SOTO, LICENCIADA EN MEDICINA POR LA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA,**

CERTIFICA:

**Que es la autora del trabajo titulado “INMUNOLOCALIZACIÓN DE LA
SUSTANCIA P Y EL RECEPTOR NEUROKININA 1 EN AMÍGDALAS
PALATINAS CON AMIGDALITIS RECURRENTE”.**

Este trabajo ha sido dirigido por D. Miguel Muñoz Sáez, doctor en Medicina y Cirugía;
D. Juan Solanellas Soler, doctor en Medicina y Cirugía; y dirigido y tutorizado por D.
Francisco Esteban Ortega, doctor en Medicina y Cirugía y profesor del Departamento de
Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, firmo la presente certificación.

Sevilla, 16 de septiembre de 2019.



Fdo: Dña. María José Reina Soto

A mi hijo,

A mi padre,

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis ha supuesto un gran reto para mí, muchas horas de esfuerzo y sacrificio que por fin se ven compensadas.

En primer lugar, debo dar mi agradecimiento al Dr. Miguel Muñoz. Definitivamente sin él no creo que hubiera sido posible hacer la tesis. Paciencia, ilusión, energía, entrega, generosidad, empuje y apoyo incansable es lo que me ha demostrado siempre durante muchos meses. Me ha transmitido su amor y respeto por la ciencia y su incorformismo. Nunca podré agradecerle lo suficiente su confianza, horas de dedicación y apoyo. Un gran científico y mejor persona, ejemplo a seguir.

En segundo lugar, quiero agradecer al Dr. Juan Solanellas su apoyo, empuje y disponibilidad. Empecé con él esta aventura y por fin terminamos esta asignatura que teníamos pendiente de hace años. Gracias por haber estado siempre ahí.

Al Dr. Francisco Esteban, maestro de la Otorrinolaringología junto al Dr. Juan Solanellas, modelos a seguir en el ámbito clínico y de la investigación.

He de agradecer al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Valme su inestimable ayuda, en concreto al Dr. Rafael Martínez, por su amabilidad y cercanía, y al Dr. Félix Conde, por su generosidad al dedicar parte de su tiempo libre a esta investigación.

Gracias al Servicio de Otorrinolaringología del Hospital de Valme, dirigido por el Dr. Solanellas y, en concreto, al Dr. Luis Soldado, por su disponibilidad y gentileza.

No quiero olvidarme de Carolina Castilla y Fernando Carmona, del Instituto de Biomedicina de Sevilla, y mostrarles mi gratitud por su permanente colaboración y disposición.

También agradecer a Luis y Ana, del equipo de investigación del Hospital de Jerez, su amabilidad y ayuda final.

Por último, quiero dar las gracias a mi padre, por su amor y bondad, y por haber ejercido de abuelo todoterreno, acompañándome a Sevilla en este proceso.

A mi hijo, que aun siendo muy pequeño, se ha visto involucrado también en esta aventura soportando mis ausencias y los viajes a Sevilla, y quien sin duda, me enseña cada día a valorar lo que realmente es importante.

A mi compañero Ismael, que ha compartido conmigo mis momentos bajos y de estrés, demostrándome su comprensión y su cuidado.

A mi madre, por tener siempre palabras de ánimo y confianza en mí. A mi hermano, ejemplo de tesón y constancia, y a mis hermanas, eternas confidentes y pilares fundamentales en mi vida.

Gracias a todos ellos, que con su impulso diario, me han ayudado a sacar lo mejor de mí y lograr este gran reto profesional.

ABREVIATURAS

AA: adenoamigdalectomía

aa: aminoácidos

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

ADN: ácido desoxirribonucleico

AP-1: proteína activadora-1

ARN: ácido ribonucleico

ASA: American Society of Anesthesiologists

ASLO: antiestreptolisina O

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

CD: célula dendrítica

CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina

CPAP: presión positiva continua en vía aérea

DAB: 3,3-diaminobencidina tetraclorhidrato

DAG: diacilglicerol

EBHGA: estreptococo β -hemolítico del grupo A

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EII: enfermedad inflamatoria intestinal

EK: endokininas

EKA: endokinina A

EKB: endokinina B

EKC: endokinina C

EKD: endokinina D

ELA: esclerosis lateral amiotrófica

ELISA: ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas

EPN: endopeptidasa neutra

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

ERK1/2: quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2

FAA: faringoamigdalitis aguda

g: gramo

GABA: ácido γ -aminobutírico

GRKs: quinasas de los receptores acoplados a la proteína G

h: hora

H₂O₂: peróxido de hidrógeno
HK-1: hemokinina-1
IAH: índice de apnea-hipopnea
IFN γ : interferón gamma
IgA: inmunoglobulina A
IGF-1: factor de crecimiento insulínico 1
IgM: inmunoglobulina M
IL-1: interleuquina 1
IL-1 β : interleuquina 1 beta
IL-2: interleuquina 2
IL-6: interleuquina 6
IL-10: interleuquina 10
IL-12: interleuquina 12
IM: intramuscular
IMC: índice de masa corporal
IP₃: Inositol trifosfato
IR: infecciones amigdalares recurrentes
Kg: kilogramo
MALT: mucosa-associated lymphoid tissue
MAPK: proteína-quinasa activada por mitógenos
 μ l: microlitro
 μ m: micrómetro
mg: miligramo
MIP-1 β : proteína inflamatoria de macrófagos-1 β
MIP-2: proteína inflamatoria de macrófagos-2
ml: mililitro
mm: milímetro
NK: natural killer
NK1: neurokinina 1
NKA: neurokinina A
NKB: neurokinina B
NKR: receptor de la neurokinina
NK1R: receptor de la NK1
NK1R-F: forma larga del receptor NK1

NK1R-T: NK1R truncado
NK2R: receptor de la NK2
NK3R: receptor de la NK3
NP: neuropéptido
NPy: neuropéptido γ
NPK: neuropéptido K
NT: neurotransmisor
PANDAS: pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with Streptococcus
PKA: proteinquinasa A
PKC: proteinquinasa C
PLC: fosfolipasa C
PMN: polimorfonucleares
Ppt-a (Tac1): gen preprotaquicinina-A
Ppt-b (Tac3): gen preprotaquicinina-B
Ppt-c (Tac4): gen preprotaquicinina-C
PSG: polisomnografía
RAPG: receptores acoplados a la proteína G
REM: rapid eye movement
RTK: receptor taquicinérgico
SAOS: síndrome de apnea obstructiva del sueño
SNC: sistema nervioso central
SNP: sistema nervioso periférico
SP: sustancia P
Tacr: gen del receptor de taquicinas
TBS: Tris-buffered saline
TGF β 1: factor de crecimiento transformante β 1
TK: taquicinas
TNF α : factor de necrosis tumoral alpha
UI: unidad internacional
VEB: virus Epstein Barr
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular
VIH: virus de la inmunodeficiencia humana
VRS: virus respiratorio sincitial

VSG: velocidad de sedimentación globular

VVZ: virus varicela zóster

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. AMÍGDALA PALATINA	2
1.1 EMBRIOLOGÍA	2
1.2 ANATOMÍA	4
2. ANILLO DE WALDEYER	7
3. PATOLOGÍA AMIGDALAR	13
3.1 AMIGDALITIS	13
3.1.1 Etiología	14
3.1.2 Epidemiología	15
3.1.3 Anatomía patológica	16
3.1.4 Clínica	16
3.1.5 Diagnóstico	18
3.1.6 Tratamiento	20
3.1.7 Complicaciones	21
3.2 HIPERTROFIA AMIGDALAR	22
3.3 SÍNDROME DE APNEA OBSTRUCTIVA DEL SUEÑO	24
3.3.1 Definición	24
3.3.2 Epidemiología	25
3.3.3 Clínica	25
3.3.4 Diagnóstico	26
3.3.5 Tratamiento	27
4. AMIGDALECTOMÍA	28
4.1 DEFINICIÓN E HISTORIA	28
4.2 INDICACIONES	30

4.3	CONTRAINDICACIONES	33
4.4	COMPLICACIONES	34
5.	SUSTANCIA P Y RECEPTOR NEUROKININA 1	35
5.1	TAQUICININAS (TK)	35
5.1.1	Estructura de las TK de mamíferos	37
5.1.2	Genes de las TK	39
5.2	RECEPTORES TAQUICINÉRGICOS (RTK)	41
5.2.1	Estructura y localización de los RTK	41
5.2.2	Genes de los RTK	44
5.3	SUSTANCIA P (SP)	45
5.4	RECEPTOR NK1 (NK1R)	48
5.5	FISIOPATOLOGÍA DE LA SP Y EL NK1R	52
5.5.1	Tracto gastrointestinal	53
5.5.2	Tracto respiratorio	54
5.5.3	Tracto urogenital	54
5.5.4	Piel	54
5.5.5	Sistema nervioso central	55
5.5.6	Sistema inmune	55
5.5.7	Nocicepción	56
5.5.8	Inflamación	57
5.5.9	Cáncer	59
5.6	ANTAGONISTAS DEL NK1R	59
5.6.1	Antagonistas peptídicos	60
5.6.2	Antagonistas no peptídicos	60
5.6.3	Aplicaciones terapéuticas	61

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	65
III. MATERIAL Y MÉTODOS	67
1. MATERIAL DE ESTUDIO	68
1.1 Material fungible	68
1.2 Material inventariable	68
1.3 Material biológico: anticuerpos y tejido amigdalario	69
2. MÉTODO DE TRABAJO	70
2.1 Diseño del estudio	70
2.2 Población de estudio	70
2.3 Número de muestras	71
2.4 Aspectos éticos de la investigación	71
2.5 Procesamiento de muestras e inmunohistoquímica indirecta	71
2.6 Valoración e interpretación de los resultados	73
IV. RESULTADOS	75
1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA DE ESTUDIO	76
2. EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA SP	76
2.1 Epitelio linforeticular	78
2.2 Folículo linfoideo	79
3. EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL NK1R	82
3.1 Epitelio linforeticular	83
3.2 Folículo linfoideo	84
4. CONTROLES NEGATIVOS	87
5. TINCIÓN CON HEMATOXILINA/EOSINA	87
V. DISCUSIÓN	89

VI. CONCLUSIONES	104
VII. ANEXO	106
VIII. BIBLIOGRAFÍA	109

I. INTRODUCCIÓN

1. AMÍGDALA PALATINA.

1.1 Embriología

Los *arcos branquiales* o *faríngeos* aparecen en la cuarta y quinta semana de desarrollo intrauterino y van a participar en el desarrollo de la cabeza y cuello contribuyendo en gran medida al aspecto externo del embrión. Estos arcos están constituidos por bandas de tejido mesenquimático separado por fuera por profundos surcos de tejido ectodérmico, denominados *hendiduras branquiales* o *faríngeas* (figura 1) y por dentro por evaginaciones de tejido endodérmico llamadas *bolsas faríngeas* (figura 2). Cada arco posee su propia arteria, nervio, elemento muscular y esquelético (cartílago o hueso) (figura 3).

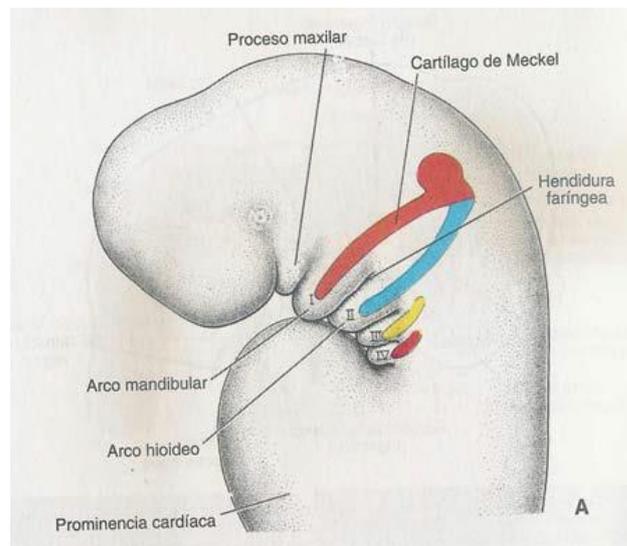


Figura 1. Vista lateral de la región de la cabeza y cuello de un embrión de 4 semanas, que muestra los cartílagos de los arcos faríngeos que participan en la formación de los huesos de la cara y el cuello (imagen tomada del libro Embriología médica Langman,1996¹).

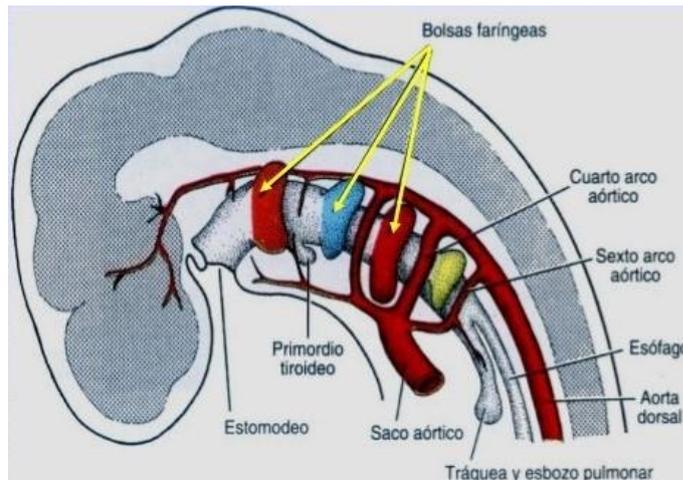


Figura 2. Esquema de las bolsas faríngeas como evaginaciones del intestino anterior faríngeo (imagen tomada del libro Embriología médica Langman,1996¹).

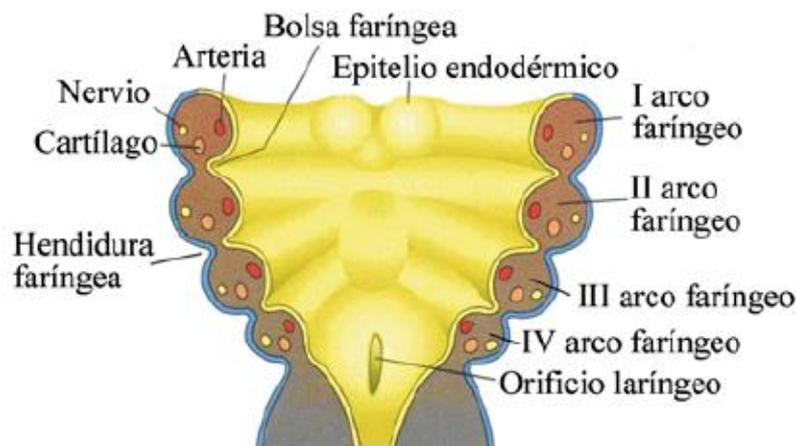


Figura 3. Esquema de los arcos faríngeos. Cada uno de ellos comprende un componente cartilagenoso, muscular, un nervio y una arteria (imagen modificada del libro Embriología médica Langman,1996¹).

La formación embrionaria de las *amígdalas palatinas* procede de la segunda bolsa faríngea. El revestimiento epitelial de la segunda bolsa faríngea prolifera y forma brotes que se introducen en el mesénquima adyacente. Los brotes son invadidos secundariamente por tejido mesodérmico, constituyendo el primordio de la amígdala palatina (figura 4). Entre el tercero y el quinto mes se produce la infiltración gradual de tejido linfático en la amígdala. Una porción de la bolsa no desaparece y se encuentra en el adulto formando la *fosita tonsilar* o *amigdalina* o *fosita de Rossenmüller*².

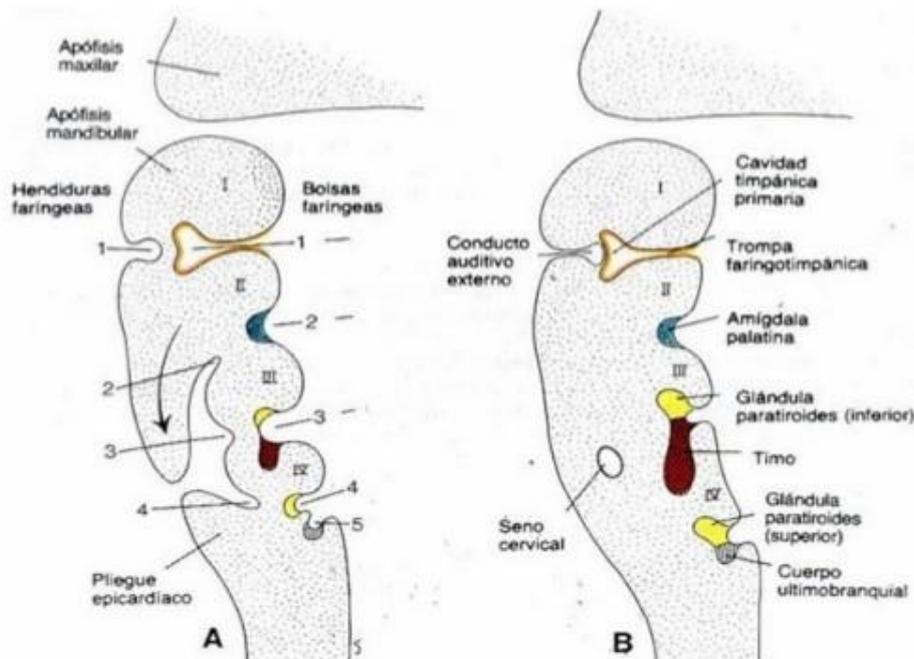


Figura 4. **A.** Esquema del desarrollo de las hendiduras y bolsas faríngeas. **B.** Los restos de la segunda, tercera y cuarta hendiduras faríngeas forman el seno cervical, que normalmente se halla obliterado. Adviértanse las estructuras formadas por las diversas bolsas faríngeas (imagen tomada del libro Embriología médica Langman, 1996¹).

1.2 Anatomía

Las *amígdalas palatinas* son órganos linfoides agregados a la mucosa del istmo de las fauces (figura 5). En número de dos, una derecha y otra izquierda, están situadas en la pared lateral de la faringe, inmediatamente por detrás de la boca, por dentro de la región cigomática y del espacio maxilofaríngeo, delante de la pared posterior de la orofaringe, debajo de la región palatina y encima de la lingual. Se hallan alojadas en la fosa amigdalina, cavidad que se encuentra bien delimitada por los dos pilares del velo palatino, arriba y en su centro, y por el arco palatogloso, por abajo.

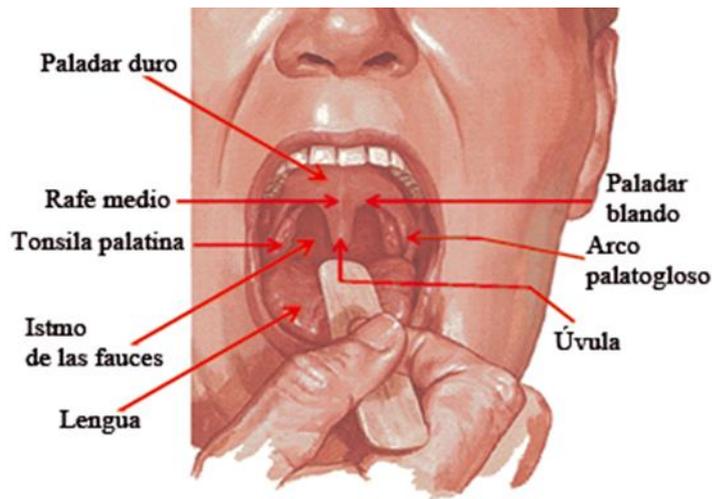


Figura 5. Cavidad oral (imagen modificada del Atlas de Anatomía Humana, Netter 1996³).

Tiene forma de almendra y sus dimensiones varían mucho en función de la edad y según los individuos; en condiciones normales, la amígdala mide 20 mm de altura por 15 de anchura y 10 de espesor⁴. Tiene una cara lisa, la **cápsula amigdalina**, unida a la pared faríngea por tejido conjuntivo laxo, pero bien vascularizado que facilita la disección quirúrgica; una cara medial, irregular, convexa que está excavada por **criptas** profundas (figura 6) y es la cara visible de la amígdala; el polo superior es alargado y libre en la parte superior de la fosa amigdalina; el polo inferior se relaciona con la raíz de la lengua, a la que está unida por la *amígdala lingual*, en general poco desarrollada en el adulto.

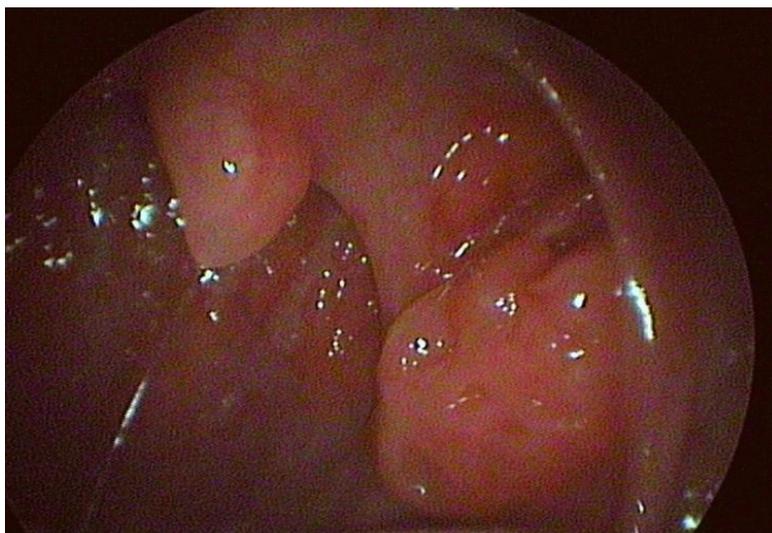


Figura 6. Criptas de amígdala palatina (imagen tomada de publicacionesmedicina.uc.cl).

Las estructuras anatómicas (figura 7) que las delimitan son⁵:

- Pilar anterior: músculo palatogloso.
- Pilar posterior: músculo palatofaríngeo.
- Lateralmente: músculo constrictor superior de la faringe que lo separa del nervio glosofaríngeo.

Está inervada por las ramas tonsilares del nervio glosofaríngeo (IX par craneal) y por el nervio palatino menor, procedente del ganglio esfenopalatino. El aporte arterial viene dado por:

- La arteria tonsilar, rama de la arteria dorsal de la lengua procedente a su vez de la arteria lingual.
- La palatina ascendente y tonsilar, ramas de la arteria facial.
- Ramas de la arteria faríngea ascendente.
- Arteria palatina mayor y menor, ramas de la palatina descendente, a su vez rama de la maxilar interna.

El drenaje venoso corresponde a las venas lingual y faríngea terminando en la yugular interna. El drenaje linfático se realiza a través de sus vasos eferentes que llegan hasta el ganglio yugulodigástrico y hasta los ganglios situados en el territorio subángulomandibular.

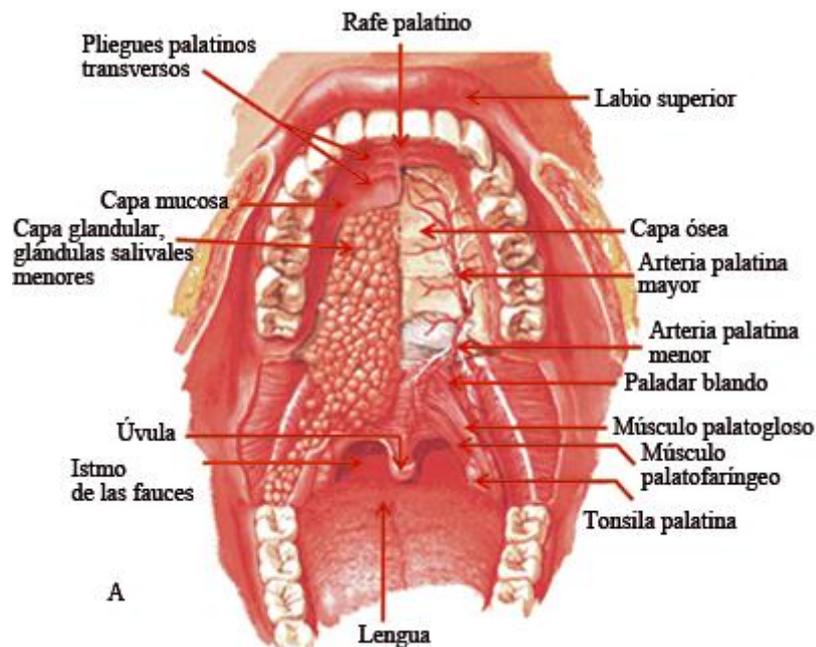


Figura 7. Pared superior de la cavidad bucal (imagen modificada del Atlas de Anatomía Humana, Netter 1996³).

2. EL ANILLO DE WALDEYER

A finales del siglo XIX, en el año 1884, el analista y patólogo alemán Heinrich Wilhelm Gottfried Waldeyer (figura 8) describe por primera vez esta estructura circular de tejido linfoideo localizado en las tres porciones de la faringe.



Figura 8. Heinrich Wilhelm Gottfried Waldeyer (1836-1921)

El anillo de Waldeyer está constituido por las amígdalas palatinas, adenoides, amígdala lingual y una serie de folículos diseminados en los espacios comprendidos entre las amígdalas.

De todos los componentes de este anillo, las **amígdalas palatinas** son las de mayor tamaño, sobre todo hasta los 10 años, comenzando su reducción a partir de esta edad. Es el único componente que contiene una cápsula que lo envuelve. Su superficie está cubierta por un epitelio estratificado plano no queratinizado que se introduce y ramifica en el espesor de la amígdala formando las criptas, donde el epitelio pasa a denominarse *epitelio linforeticulado* o *criptoreticular* pues se compone de células epiteliales, queratinocitos modificados llamados células M o de membrana, células mononucleares, macrófagos y células dendríticas foliculares⁵ (figura 9).

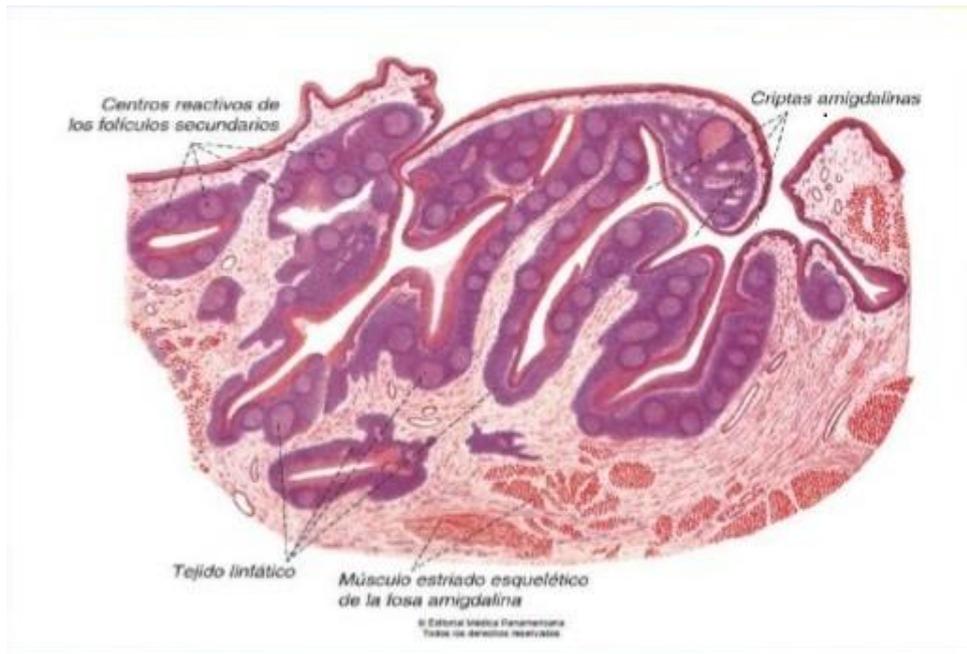


Figura 9. Amígdala palatina humana, vista general. El epitelio estratificado plano no queratinizado forma invaginaciones profundas y ramificadas (criptas). Éstas se encuentran rodeadas por tejido linfático con folículos secundarios abundantes (imagen tomada del libro Sobotta Histología, 2010⁶).

Un segundo componente del anillo de Waldeyer es la **amígdala faríngea, amígdala de Luschka** o **adenoides** que se localiza en la rinofaringe o cavum nasofaríngeo (figura 10). Tiene forma de pirámide triangular y su desarrollo se termina alrededor del séptimo mes de gestación. Su aspecto clásico se alcanza entre los 2 y 4 años, cuando adquiere su máximo desarrollo y remite a partir de los 12 a 13 años de edad. Su aporte vascular procede de la arteria faríngea ascendente, de ramas faríngeas de la maxilar interna y facial. El drenaje venoso termina en el plexo parafaríngeo, y a su vez, en la vena yugular interna y en la vena facial. Sus linfáticos eferentes alcanzan el espacio retrofaríngeo y faringomaxilar. La innervación viene dada por el plexo parafaríngeo. Se halla tapizada por un epitelio pseudoestratificado columnar ciliado que con regularidad puede estar interrumpido por epitelio estratificado plano no queratinizado. No hay criptas típicas, sino pliegues y recesos irregulares. Al igual que en la amígdala palatina, el epitelio linforeticular se dispone de modo difuso.

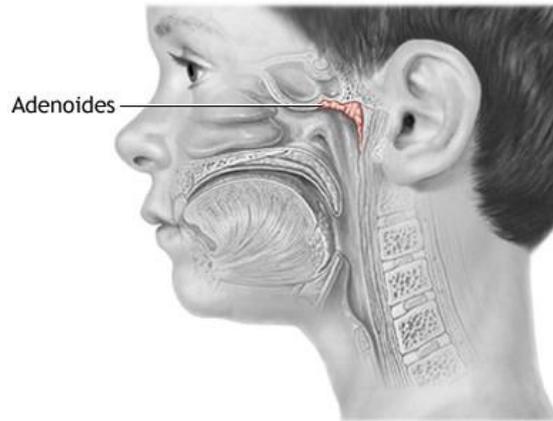


Figura 10. Adenoides (imagen tomada de medlineplus.gov).

De forma inconstante se pueden encontrar folículos linfáticos en la mucosa que rodea el orificio faríngeo de la trompa auditiva constituyendo las **amígdalas tubáricas o de Gerlach**⁷.

Por último, de morfología similar a la amígdala palatina, aunque menos compleja es la **amígdala lingual**. Se sitúa en la base de la lengua y también está cubierta por epitelio estratificado plano no queratinizado (figura 11). En su superficie es posible ver las criptas, frecuentemente ocupadas por las secreciones procedentes de las glándulas mucosas. Su aporte arterial viene dado por las arterias lingual, la faríngea ascendente y la facial. Su drenaje venoso viene dado por la vena lingual. El drenaje linfático es al ganglio yugulodigástrico y al yuguloomohiodeo, quedando su inervación encomendada al nervio glossofaríngeo.

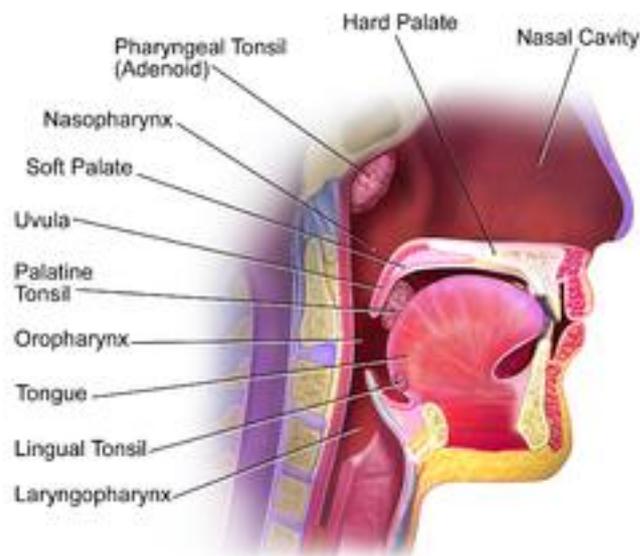


Figura 11. Amígdala lingual, palatina y faríngea (imagen tomada de es.wikipedia.org).

El anillo de Waldeyer se sitúa bajo una cubierta mucosa especializada (tejidos linfoides asociados a mucosa, de las siglas en inglés: MALT) que, al igual que las placas de Peyer en el intestino o el apéndice vermiforme cecal, protege al organismo de la entrada de agentes extraños, ya sea por vía aérea o por vía digestiva. La amígdala faríngea, debido a su localización, analiza las partículas transportadas por vía aérea y presentes en el moco nasal, mientras que el análisis de los agentes que entran por la boca viene dado por las amígdalas palatinas, cuyo epitelio activo a nivel de las criptas permite tanto la entrada como el remanso de partículas del bolo alimenticio, lo cual amplía la duración del tiempo de contacto.

Fioretti⁸ definió la unidad funcional de la amígdala como “criptolinfona”, formada por un folículo linfoides, su área parafolicular y el **epitelio críptico** denominado **linforeticular** (figura 12). Este epitelio está constituido por una mezcla de células epiteliales, células mononucleares, macrófagos y células dendríticas. Su función está dirigida al análisis del antígeno con el que toma contacto, siendo las células M (células de membrana) las iniciadoras del proceso, pues van a captar y facilitar tanto la penetración como el transporte del antígeno.

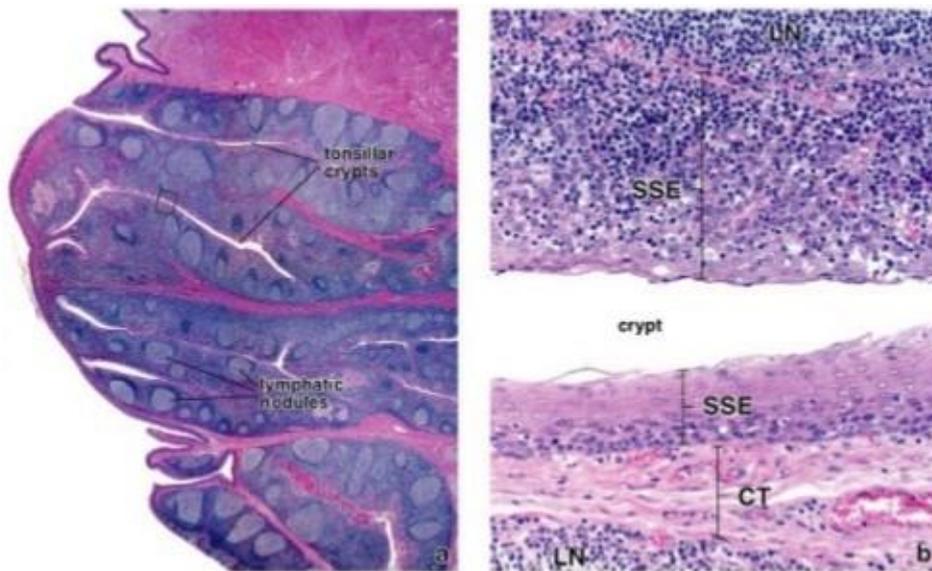


Figura 12. Microfotografías de una amígdala palatina. **a.** El epitelio estratificado plano de la superficie de la amígdala se invagina en el tejido conjuntivo subyacente para formar las criptas amigdalinas. 25x **b.** Esta microfotografía con más aumento de la región contenida en el rectángulo de **a** muestra el epitelio estratificado plano (SSE) que reviste la cripta amigdalina. En la parte de la fotografía que está debajo de la luz de la cripta el SSE aparece bien delimitado y se halla separado del nódulo linfático (LN) por una capa de tejido conjuntivo (CT). En la parte superior

de la imagen el *SSE* apenas puede reconocerse a causa de la gran infiltración linfocítica. El nódulo linfático ha proliferado dentro del epitelio, lo ha distorsionado y ha hecho desaparecer el límite bien definido entre el tejido epitelial y el tejido conjuntivo. 450x. (Imagen tomada del libro *Histología Ross & Pawlina, 2007*⁹).

Las células dendríticas dan apariencia tubulovesicular a este epitelio, con tramos intraepiteliales que van a permitir que el antígeno penetre directamente desde el exterior y se ponga en contacto con la célula linfoide efectora. Se conoce que ésta es una capacidad inherente al anillo de Waldeyer y que no ocurre en los ganglios linfoides, pues a ellos acceden los antígenos a través de los vasos linfáticos aferentes.

Con respecto al parénquima amigdalal, se pueden distinguir dos componentes: el *folicular* y rodeándole, el *extrafolicular*. En el folicular, histológicamente se puede diferenciar el folículo linfoideo primario y el folículo linfoideo secundario, siendo éste el biológicamente activo:

1. **Folículo linfoideo primario:** se corresponde con conglomerados de células B vírgenes o *naive*, que aún no han tomado contacto con antígenos. Cuando esto ocurre se forman los folículos linfoideos secundarios.
2. **Folículo linfoideo secundario** (figura 13), está formado por:
 - *Centro germinal:* su función es la replicación y diferenciación de las células precursoras linfoides.
 - *Manto linfoideo:* rodea al centro germinal a modo de corona y está formado por linfocitos maduros. La zona que está junto al epitelio linforetico se halla más engrosada recibiendo el nombre de *capa polar*.

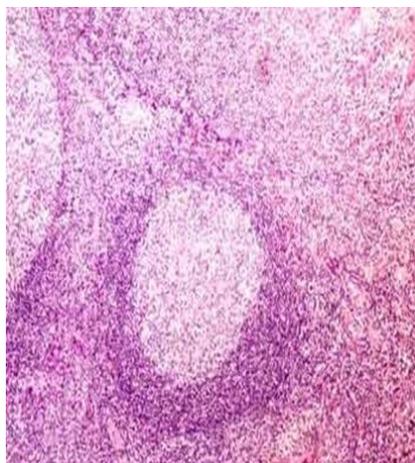


Figura 13. Folículo linfoideo secundario (imagen tomada del libro virtual de formación en ORL⁵).

Histológicamente este parénquima amigdalario está formado por **células T** tanto en el área extrafolicular como en el epitelio linfocitario, siendo en condiciones normales más abundante la población *helper* que la supresora. En los centros germinales también hay células T, pero sólo de la variante *helper*.

Las **células B** maduras, se encuentran en el manto linfocitario del folículo secundario y en el epitelio críptico, junto a la capa polar; mientras que las células presentadoras del antígeno se distribuyen de manera muy similar a las células T, es decir, en las zonas extrafoliculares, epitelio críptico y en los centros foliculares. Además, en los centros foliculares se distribuyen las **células dendríticas** foliculares, cuya función consiste en presentar el antígeno a las células B.

Se ha constatado la producción y secreción de **inmunoglobulinas**, concretamente IgM e IgA, no solo al torrente circulatorio sino también al tubo digestivo. Su función radica en proteger de agresiones externas la mucosa del tracto aerodigestivo hasta la porción inferior del intestino, pues resisten la acción proteolítica de los jugos gástricos. Para que estas inmunoglobulinas sean eficaces es necesario su unión a un polipéptido de bajo peso molecular denominado **cadena J**, sintetizado por las células epiteliales y cuya misión va a permitir la unión de dichas inmunoglobulinas a su receptor celular. Para que dicha acción se lleve a cabo, es necesario que en los folículos secundarios tenga lugar tanto la producción como la diferenciación de la célula B en **inmunocito**, o en célula con capacidad sintetizadora de inmunoglobulinas, hecho que se da a partir de las dos semanas de vida postnatal.

La función inmunológica de las amígdalas implica una serie de eventos en forma de cascada, tanto local como sistémica. En un primer lugar se da la captación y presentación del antígeno por las células M, células dendríticas y macrófagos. El antígeno sufrirá un proceso de proteólisis en el interior de la célula presentadora para que pueda ser reconocido por las células efectoras (células T y B). Los linfocitos activados, tras ser estimulados por el antígeno biológicamente activo, liberan mediadores, es decir, interleuquinas que van a estimular otras células del sistema inmune, amplificando así la respuesta. El antígeno activado será transportado al área extrafolicular y alcanzará los folículos primarios, donde interaccionará con las células T, que a su vez liberarán otros mediadores para estimular a las células B vírgenes o *naive*. Una vez estimuladas, formarán los folículos secundarios, que contienen células B en diferentes estadios de maduración. Las células B estimuladas de forma inespecífica van a sufrir una expansión

policlonal, mientras que las células B estimuladas específicamente se van a diferenciar en células plasmáticas formadoras de inmunoglobulinas y en células memoria.

No obstante, esta función defensiva del anillo de Waldeyer se potencia y amplifica mediante la participación de todo el sistema inmune, así como con la ayuda de métodos sistémicos de defensa inespecíficos, tales como la activación del complemento, fagocitosis, liberación de histamina por parte de los mastocitos o la liberación de linfoquinas por los linfocitos T activados. Toda esta activación de respuestas conlleva una modificación del estado humoral del paciente, constatados objetivamente por parámetros como la velocidad de sedimentación globular (VSG), proteína C reactiva, antiestreptolisina O (ASLO), etc., que nos pueden ayudar tanto a medir el grado de infección como la capacidad de respuesta del huésped.

La capacidad inmunocompetente tiene un periodo de actividad máxima. En el caso de las amígdalas palatinas quedaría comprendido entre los 4 y los 10 años, comenzando su involución a partir de la pubertad y objetivándose una disminución de la población de células B y un incremento de la relación T/B. Se ha visto que en sujetos sanos de edad avanzada aún poseen capacidad sintetizadora de inmunoglobulinas. En el caso de la adenoides, la actividad inmunológica máxima es en el periodo perinatal, siendo su involución más precoz.

3. PATOLOGÍA AMIGDALAR

3.1 Amigdalitis

La faringoamigdalitis aguda (FAA) se define como un proceso agudo febril, generalmente de origen infeccioso, que cursa con inflamación de las mucosas de la faringe y/o de las amígdalas palatinas (figura 14). Es una de las infecciones respiratorias más comunes en nuestro medio y una de las razones más frecuentes por las que se prescribe un antibiótico en nuestro país, con una tasa aproximada de prescripción del 80%¹⁰.

El epitelio críptico es el lugar de la faringe con menos resistencia a las infecciones. Las bacterias y diversos antígenos escapan de la acción del batido ciliar y del barrido de las contracciones deglutorias, favoreciendo la colonización bacteriana. Pero por otra parte dicho epitelio permite que se establezca un amplio contacto entre gérmenes y el sistema inmune amigdalino para la fabricación de anticuerpos, lo que conlleva a postular que el primer brote de FAA se podría considerar como una vacuna fisiológica, si bien, los

gérmenes que habitualmente provocan esta patología confieren una inmunidad muy corta en el tiempo^{5,11}. Durante la infancia estos cuadros son más frecuentes pues el niño está en un periodo de adaptación inmunológica.



Figura 14. Amigdalitis aguda (imagen tomada del libro virtual de formación en ORL¹¹).

3.1.1 Etiología

Entre el 50% y el 80% de las FAA infecciosas son de origen vírico, donde predominan los rinovirus, coronavirus y virus parainfluenza, y más raramente el herpes simple. Además, aproximadamente el 1-10% de los casos son causados por el virus Epstein-Barr (VEB, que ocasiona la *mononucleosis infecciosa*)¹². La causa más frecuente de etiología bacteriana es el **Streptococcus pyogenes** o **estreptococo β -hemolítico del grupo A (EBHGA)**, que supone el 20-30% de todas las FAA en niños y el 5-15% en adultos^{13,14}. Otras bacterias implicadas en la FAA en nuestro medio son: estreptococos β -hemolítico del grupo C y G, *Fusobacterium necrophorum*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae* (en adolescentes y adultos que practican sexo oral-genital)^{15,16,17}.

El EBHGA es responsable del 30-40% de las FAA que se observan en niños de 3-13 años, del 5-10% en niños entre los 2 y 3 años y solo del 3-7% en menores de 2 años. Aunque ocurran, las FAA por EBHGA son muy raras en niños menores de 2 años, e insólitas en los menores de 18 meses. La edad del niño, la estación del año y el área geográfica en la que vive influyen en el tipo de agente causal. En la Tabla 1 se muestran los microorganismos que pueden producir una FAA. En un 30% de los casos no se identifica ningún patógeno.

Tabla 1. Causas infecciosas de faringoamigdalitis aguda¹⁸.

Microorganismos	Síndrome o enfermedad Hallazgos clínicos y epidemiológicos	Incidencia (en %)
VIRUS		
Rinovirus	Resfriado común. Predominan en otoño y primavera	20
Coronavirus	Resfriado común. Predominan en invierno	≥5
Adenovirus	Fiebre faringoconjuntival. Predomina en verano.	5
Virus herpes simple tipo 1 y 2	Gingivoestomatitis (primoinfección): vesículas y úlceras superficiales en el paladar. Puede cursar con exudados faríngeos	4
Virus influenza	Gripe: fiebre, mialgias, cefalea, tos	2
Virus parainfluenza	Resfriado, crup	2
Virus Coxsackie A	Herpangina, enfermedad mano-pie-boca	<1
Virus de Epstein-Barr	Mononucleosis infecciosa. Los anticuerpos heterófilos generalmente no suelen ser positivos hasta la segunda semana de enfermedad, ni consistentemente positivos en menores de 4 años	<1
Citomegalovirus	Síndrome mononucleósico. A diferencia del causado por VEB: faringitis menos evidente y mayor elevación de transaminasas	<1
Virus de la inmunodeficiencia humana	Infección aguda primaria: fiebre, mialgias, artralgias, malestar general, exantema maculopapular no pruriginoso, que se sigue de linfadenopatía y ulceraciones mucosas sin exudado	<1
BACTERIAS		
Estreptococo betahemolítico del grupo A	Faringitis, escarlatina	15-30
Estreptococo betahemolítico grupos C y G	Faringitis. Serogrupos no reumatógenos	5
Anaerobios	Angina de Vincent (gingivoestomatitis necrotizante): encías muy inflamadas y dolorosas, con úlceras en las papilas interdentes, que sangran con facilidad. Se acompaña de fiebre, malestar general, halitosis y linfadenopatías	<1
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	Síndrome de Lemierre (tromboflebitis séptica de la vena yugular interna): dolor, disfagia, tumefacción y rigidez de cuello	<1
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	Faringitis, exantema escarlatiniforme (en superficie de extensión de los brazos). Más frecuente en adolescentes. Puede cursar con exudados faríngeos	<1
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Faringitis	<1
<i>Treponema pallidum</i>	Sífilis secundaria	<1
<i>Francisella tularensis</i>	Tularemia faríngea. Consumo de carne poco cocinada de animales silvestres o agua contaminada	<1
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Difteria. Puede cursar con exudados faríngeos	<1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Faringitis, enterocolitis. Puede cursar con exudados faríngeos	<1
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Bronquitis, neumonía	<1
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Bronquitis, neumonía	<1
<i>Chlamydia psittaci</i>	Psitacosis	<1

3.1.2 Epidemiología

La infección aguda de la mucosa y tejido orofaríngeo representa el 50% de los motivos de consulta por infección respiratoria alta en atención primaria. En adultos puede ocasionar hasta 6 días de baja laboral por episodio.

La mayor incidencia suele ser en las estaciones de invierno y primavera, aunque también pueden verse al principio del verano, como en el caso de los adenovirus.

El mecanismo de transmisión es por vía respiratoria, a través de las *gotas de Flügge* (gotas de saliva que se expelen al hablar, toser o estornudar) desde personas infectadas. También se han descrito brotes por contaminación de alimentos o agua; por el contrario, los fómites no parecen desempeñar un papel importante como fuente de contagio¹⁸.

Todos los grupos poblacionales están igualmente expuestos a la FAA, independientemente de su nivel socioeconómico o profesión.

3.1.3 Anatomía patológica

El tejido amigdalal va a mostrar gran inflamación, con acúmulo de leucocitos polimorfonucleares, abscesos múltiples y zonas de necrosis, así como exudado. Aparece hiperplasia reticular que va a disminuir la zona cortical¹¹.

3.1.4 Clínica

Es difícil diferenciar entre etiología vírica (la más frecuente) y estreptocócica, pero en la tabla 2 se reflejan algunas características que nos ayudarán a la orientación diagnóstica de la FAA.

Tabla 2. Hallazgos clínicos y epidemiológicos según etiología.

<p>Sugestivos de infección por EBHGA Dolor de garganta de comienzo brusco Odinofagia Fiebre Exantema escarlatiniforme Cefalea Náuseas, vómitos, dolor abdominal Eritema o exudados faringoamigdalares Petequias en el paladar blando Pequeñas pápulas eritematosas y anulares, con centro pálido (lesiones “donuts”), en paladar blando y/o duro Úvula roja y edematosa Adenopatías cervicales anteriores, aumentadas de tamaño (>1cm) y dolorosas Edad: 5-15 años Presentación en invierno o comienzos de la primavera (en climas templados) Historia de exposición a enfermo con FAA en las 2 semanas previas</p> <p>Sugestivos de infección vírica Conjuntivitis Rinorrea Afonía Tos Diarrea Exantemas o enantemas característicos Hepatoesplenomegalia Adenopatías generalizadas</p>

Clásicamente, las FAA víricas se han clasificado como FAA rojas, y las bacterianas, como FAA blancas, en base a la presencia o no de exudado. Sin embargo, hasta un 65% de las de origen vírico cursan con exudado faríngeo y un 30% de las bacterianas pueden cursar sin exudado. El síntoma local más importante es el dolor de garganta y la odinofagia. Se produce también sialorrea, edema local y otalgia refleja. La presencia de petequias en el paladar blando no es específica de infección por EBHGA, pues también se han descrito en la rubéola, infección por herpes simple y VEB. Más específica de infección por EBHGA es la existencia de pequeñas pápulas eritematosas con centro pálido en el paladar blando y/o duro llamadas *donuts*. En menores de 3 años, la FAA por EBHGA suele tener un comienzo más indolente, con inflamación faringoamigdal, congestión nasal con secreción mucopurulenta, fiebre, adenopatía cervical anterior dolorosa y lesiones tipo impétigo en narinas, proceso conocido como *estreptococosis* o *fiebre estreptocócica*.

En las FAA por adenovirus, más frecuentes en menores de 3 años, la clínica se manifiesta con fiebre elevada mayor de 39°, exudado amigdal, asociado en un 50%, adenopatía cervical anterior, rinorrea, tos y/o conjuntivitis en un 15-25%, lo que hace a este cuadro conocido como *fiebre faringoconjuntival*, difícil de distinguir de la infección estreptocócica.

Si la sintomatología persiste a pesar de un tratamiento adecuado, debemos pensar en la *mononucleosis infecciosa* o *enfermedad del beso*, más frecuente en adolescentes (figura 15). Cursa con fiebre, faringoamigdalitis, adenopatías dolorosas laterocervicales e incluso hepatoesplenomegalia. La toma de antibióticos puede desencadenar un exantema maculopapular característico hasta en un 90% de los casos.



Figura 15. Mononucleosis infecciosa (imagen tomada de elblogdelasalud.info).

Otra forma de presentación de infección por EBHGA es la *escarlatina* que es debida a cepas productoras de toxinas eritrogénicas y que cursa con exantema micropapuloso, más acentuado en los pliegues (*signo de Pastia*), lengua aframbuesada y descamación durante el periodo de convalecencia. En la actualidad es menos frecuente y virulenta que antaño.

3.1.5 Diagnóstico

Se basa en una buena anamnesis y en la exploración clínica, aunque se debe completar en casos resistentes o recidivantes con pruebas complementarias, como pueden ser un frotis faríngeo para buscar el germen causal, y un estudio analítico que muestre el aumento de VSG y leucocitosis teniendo en cuenta que en ocasiones las de origen viral pueden mostrar, a diferencia de las bacterianas, una leucopenia. Se tiende al sobrediagnóstico de FAA de origen estreptocócico, con la consiguiente prescripción innecesaria de antibióticos. Con el fin de facilitar el diagnóstico, se han propuesto varias escalas de puntuación según las manifestaciones clínicas y datos epidemiológicos. Una de las más empleadas es la de **McIsaac**, basada en los **criterios de Centor** pero ponderando la edad^{19,20} (tabla 3).

Tabla 3. Criterios de McIsaac y actitud según resultado¹⁸.

Criterios	Puntos
1. Fiebre (>38°C)	1
2. Hipertrofia o exudado amigdalares	1
3. Adenopatía laterocervical anterior dolorosa	1
4. Ausencia de tos	1
5. Edad	
• 3-14 años	1
• > 15 años	0
0-1 punto: no estudio microbiológico (riesgo de infección por EBHGA: 2-6%).	
2-3 puntos: estudio microbiológico y tratar sólo si es positivo (riesgo: 10-28%).	
4-5 puntos: estudio microbiológico e iniciar tratamiento antibiótico, si se realiza cultivo, a la espera del resultado (riesgo: 38-63%)	

La presencia de síntomas virales, aunque la puntuación en la escala sea mayor de dos puntos, anula la indicación de realizar pruebas microbiológicas. En pacientes con 2 criterios de Centor la situación es indeterminada, y en la actualidad la guía NICE considera en este grupo la prescripción diferida de antibióticos²¹. Little et al.²² observaron que los pacientes asignados a la prescripción diferida de antibióticos consumieron menos

de la mitad de antibióticos y refrecuentaron un 40% menos que los que fueron tratados con antibióticos de forma inmediata.

Los métodos microbiológicos que existen para la detección del EBHGA son el test rápido del estreptococo y el cultivo faríngeo.

1. Test de detección rápida de antígeno estreptocócico (TDR): se basa en la extracción del antígeno carbohidrato del EBHGA mediante un frotis faríngeo y en la posterior detección de éste mediante anticuerpos específicos. Su principal ventaja es la disponibilidad del resultado en el mismo momento de la consulta (10-20 minutos). No es útil para la identificación de estreptococos del grupo C y G. Tiene una sensibilidad en torno al 85% y una especificidad del 95%, por lo que, basándose en su alta especificidad, un resultado positivo indica el inicio de tratamiento antibiótico. Si el resultado del test es negativo algunos expertos recomiendan la realización de cultivo, mientras que otros solo lo recomiendan cuando se dan ciertos factores de riesgo (antecedentes de fiebre reumática aguda o glomerulonefritis postestreptocócica)¹⁸.
2. Cultivo de muestra faringoamigdal: es la prueba de referencia para conocer la etiología de la infección. La sensibilidad es del 90-95% y la especificidad del 99%. Su principal desventaja es el tiempo que se tarda en obtener los resultados, en el mejor de los casos, 24-48 horas. Otro inconveniente es que no distingue de infección aguda y portador (la incidencia de cultivo positivo en portadores asintomáticos puede llegar al 40%²³). Las principales ventajas son la identificación y determinación de la sensibilidad antimicrobiana del EBHGA y/o de otras bacterias causantes de FAA, la vigilancia de las resistencias antimicrobianas y el conocimiento de los serotipos circulantes en cada periodo, lo que permitiría diferenciar entre recidivas y reinfecciones.

El hemograma se indica en casos de amigdalitis insidiosa, supuración locorregional, amigdalitis con pseudomembranas, aparición de úlcera necrótica y sospecha de mononucleosis. Las serologías no se usan debido a su coste-beneficio y al tiempo que tarda en obtener un resultado válido. Los anticuerpos antiestreptococo (los más usados son los antiestreptolisina O o ASLO) aumentan la primera semana de la infección hasta un máximo entre la 3ª y 5ª semana y disminuyen progresivamente hasta aproximadamente el año. Un título aumentado de ASLO indica el antecedente de infección estreptocócica pero no justifica en absoluto una antibioterapia prolongada ni una amigdalectomía. La

utilización de estas determinaciones solo indica que existe o ha existido en alguna ocasión infección por estreptococo, no tiene valor para el diagnóstico del proceso agudo¹¹.

3.1.6 Tratamiento

Debe incluir medidas generales, tratamiento sintomático (analgésicos y antipiréticos clásicos como paracetamol, antiinflamatorios, antisépticos locales) y en caso de sospecha de infección bacteriana se deben emplear antibióticos, pues tiene como fundamento la prevención de procesos como la fiebre reumática, aminorar las complicaciones supurativas, evitar el contagio, acortar el curso clínico y mejorar la sintomatología. El uso de corticoides para el alivio del dolor puede resultar beneficioso en adultos¹².

Una revisión Cochrane²⁴ en 2013 (nivel 1 de evidencia), examinó el papel de los antibióticos en presencia de EBHGA al incluir 17 ensayos clínicos que comparaban penicilina con otros antibióticos (cefalosporinas, macrólidos, carbacefem y sulfonamidas) y clindamicina con ampicilina. El estudio concluyó que no había diferencias significativas entre los antibióticos estudiados. En la actualidad, no existe resistencia del EBHGA a la penicilina y como es segura, sigue siendo el antibiótico de primera línea en las FAA bacterianas¹².

El tratamiento antibacteriano debe administrarse durante 10 días, pues una pauta inferior presenta un menor porcentaje de erradicación de EBHGA, a excepción de la azitromicina, cuya pauta es de 5 días^{25,26}. La amoxicilina asociada a ácido clavulánico no es de primera elección pues es un antibiótico de amplio espectro y el *Streptococcus Pyogenes* no produce betalactamasas. Las cefalosporinas en niños sólo están indicadas si existe una reacción retardada a penicilina, no anafiláctica, y como posible opción en recaídas frecuentes de FAA por EBHGA. Los macrólidos se reservan a los casos de alergia a penicilina. En España se ha visto incrementado el número de cepas de EBHGA resistentes a los macrólidos de 14 átomos (eritromicina, claritromicina) y de 15 átomos (azitromicina), siendo una situación reversible tras la disminución de su uso. En estos casos, se pueden emplear macrólidos de 16 átomos (josamicina, midecamicina) o la clindamicina (también empleada como alternativa en casos de alergia a la penicilina, bocas sépticas o amigdalitis recurrentes ya que tienen gran efecto sobre bacterias anaerobias de la faringe productoras de beta-lactamasas). En la tabla 4 se muestran las dosis y pautas de antibióticos recomendados en las FAA estreptocócicas.

Tabla 4. Tratamiento antibiótico de las FAA estreptocócicas¹⁸.

- Primera elección. Cualquiera de las siguientes dos opciones:
 - Penicilina V (fenoximetilpenicilina potásica o benzatina) durante 10 días
 - Menores de 12 años y de 27 kg: 250 mg cada 12h
 - Mayores de 12 años o de 27 kg: 500 mg cada 12h
 - Amoxicilina durante 10 días
 - 40-50 mg/kg/día cada 12h o 24h
 - Máximo 500 mg cada 12h o 1 g cada 24h
- En caso de mal cumplimiento vía oral o vómitos:
 - Penicilina G benzatina, dosis única IM profunda
 - Menores de 12 años y de 27 kg: 600.000 UI
 - Mayores de 12 años o de 27 kg: 1.200.000 UI
- Alergia a penicilina (reacción retardada):
 - Cefadroxilo durante 10 días
 - 30 mg/kg/día cada 12h. Máximo 1g cada 24h
- Alergia a penicilina (reacción inmediata o acelerada):
 - Azitromicina durante 5 días^{25,26}
 - 12 mg/kg/día cada 24h. Máximo 500 mg/dosis
 - Si resistencia a macrólidos, de 14 y 15 átomos (eritromicina, claritromicina y azitromicina)
 - Clindamicina: 20 mg/kg/día cada 8h, 10 días (máximo 900 mg/día)
 - Josamicina: 30-50 mg/kg/día, cada 12h, 10 días (máximo 1g/día)
 - Diacetato de midecamicina: 40 mg/kg/día, cada 12h, 10 días (máximo 1,5 g/día)

Según una de las guías que utilizamos en Atención Primaria como referencia²⁷, en los casos de **FAA estreptocócicas recurrentes** (5 ó más episodios de amigdalitis aguda durante 1 año con episodios incapacitantes, o bien, FAA con cultivo positivo por EBHGA que se presenta en un corto periodo de tiempo después de haber completado un tratamiento antibiótico adecuado durante 10 días) el tratamiento de elección es Penicilina G Benzatina IM, 600.000 UI en dosis única en niños <27 kg de peso y 1.200.000 UI en niños >27 kg y adultos. Como alternativa se emplearía otro antibiótico con mayor estabilidad frente a las betalactamasas, producidas por bacterias distintas del EBHGA que pueden estar presentes en la orofaringe y dificultar la acción de la penicilina, como es la amoxicilina-clavulánico 40mg/kg cada 12 horas, 10 días (dosis máxima 1g/día) en niños y 500 mg/125mg cada 12h, 10 días en adultos²⁶.

3.1.7 Complicaciones

Las complicaciones vienen derivadas fundamentalmente de los casos de *S. pyogenes* con mala evolución; diferenciándose dos cuadros: complicaciones supurativas y no supurativas.

a) **Complicaciones supurativas.** Por afectación de estructuras contiguas o de aquéllas en las que drenan: absceso periamigdalino, absceso retrofaríngeo, mastoiditis, otitis media aguda, sinusitis, linfadenitis cervical supurada, celulitis cervical. Otras complicaciones mucho menos frecuentes son: meningitis, absceso cerebral, trombosis de los senos venosos intracraneales, neumonía estreptocócica, artritis supurada, osteomielitis, absceso hepático, endocarditis, shock tóxico, sepsis estreptocócica, fascitis necrotizante.

b) **Complicaciones no supurativas.** Se piensa que pueden producirse por similitud antigénica con proteínas del germen que inducirán una reacción autoinmune en el huésped. Destacan la fiebre reumática aguda, la glomerulonefritis postestreptocócica, la artritis reactiva postestreptocócica, el eritema nodoso, la púrpura anafilactoide y los desórdenes neuropsiquiátricos autoinmunes pediátricos o PANDAS.

3.2 Hipertrofia amigdalal

En la primera infancia, el anillo linfático de Waldeyer experimenta un aumento fisiológico de su tamaño hasta la pubertad, mostrando luego una progresiva atrofia. La amígdala palatina, a partir de los 10 años, se va reduciendo progresivamente de tamaño y funcionalidad, siendo este proceso más evidente a partir de los 20 años. La amígdala faríngea alcanza su máximo desarrollo entre los 5 y 7 años de edad, a partir de los cuales comienza su involución, de tal manera que puede tener una expresión mínima en adultos. Las amígdalas linguales, sin embargo, persisten a lo largo de la vida adulta, sufriendo una involución menor y muy tardía (figura 16).

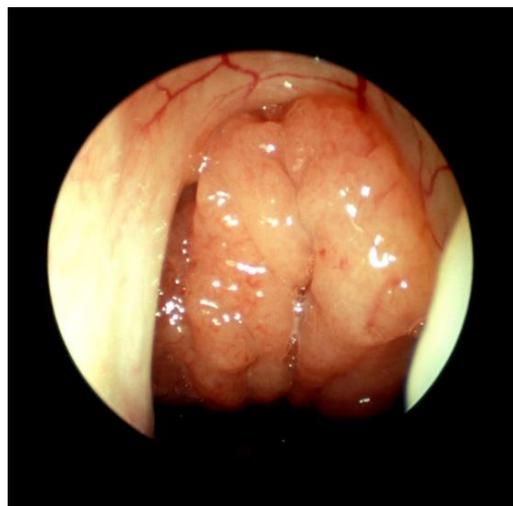


Figura 16. Hipertrofia adenoidea, visión endoscópica.

Se distinguen dos tipos de hiperplasia amigdalares:

1. La *Hiperplasia simple y pura* es de tipo constitucional y no patológica, aunque pueda acarrear consecuencias patológicas. Se debe a un aumento general del parénquima amigdalares. Se produce un aumento de la actividad celular en los folículos linfoides, diferente del fenómeno inflamatorio de la amígdala, en el que la hipertrofia se produce en el estroma del tejido conectivo. En este tipo de hiperplasia hay un gran desarrollo de los folículos y de todo el sistema críptico que se hipertrofia.
2. La *pseudohipertrofia fibrosa* se produce por una sustitución de los elementos linfoides por tejido conjuntivo fibroso tras las agresiones infecciosas recidivantes. Los tratamientos antibióticos de repetición predisponen a esta proliferación fibrosa. En este tipo de hipertrofia se observa menos actividad inmunitaria que en la hiperplasia pura.

Hipertrofia de la amígdala faríngea o adenoides: es muy frecuente en la población infantil, de hecho, la prevalencia de la respiración bucal es del 25% en los niños de entre 7 y 10 años de edad²⁸. Los síntomas dependen del grado de obstrucción. Pueden presentar sensación de taponamiento nasal, rinorrea, aumento de infecciones nasosinusales, rinolalia cerrada, hiposmia o anosmia, cefalea, otitis media secretora y recurrentes, halitosis, tos. La respiración a través de una vía aérea estenosada puede producir roncopatía y apnea obstructiva del sueño, entidad que posteriormente desarrollaremos. La respiración bucal adquirida puede facilitar trastornos de alimentación y del desarrollo estatura-ponderal. Una obstrucción nasal intensa mantenida durante mucho tiempo provoca la denominada *facies adenoidea* en niños que mantienen de forma constante la boca abierta, con aparición de hipoplasia maxilar superior (con malposición y maloclusión dentarias), platirrinia y trastornos temporomandibulares. Esta deformación de la facies es una de las causas más frecuentes de desviación del tabique en adultos.

Hipertrofia de las amígdalas palatinas: puede producir alteración de la deglución, rinolalia o voz amigdalares, roncopatía y el síndrome de apnea obstructiva del sueño. Los pacientes con gran hipertrofia amigdalares pueden igualmente desarrollar facies adenoidea.

Hipertrofia de la amígdala lingual: puede pasar desapercibida en ocasiones, pero en otras puede producir malestar en la deglución, náuseas, sensación de cuerpo extraño

faríngeo, tos y voz amigdalares. También puede llegar a producir el síndrome de apnea obstructiva del sueño si se reduce de manera importante la luz aérea a nivel de la base de la lengua.

Los cambios estructurales que se producen en la hipertrofia amigdalares se traducen funcionalmente en un descenso de la producción local de inmunoglobulinas, tanto cuantitativa como cualitativamente, y en una hipofunción linfocitaria local. Lo anterior hace suponer que la hipertrofia amigdalares constituye un factor predisponente o favorecedor de las faringoamigdalitis de repetición.

3.3 Síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS)

El SAOS en la infancia difiere del adulto tanto en su etiología como en sus manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento (tabla 5).

Tabla 5. Diferencias entre niños y adultos²⁹.

	NIÑOS	ADULTOS
Edad (Años)	2-6	45-55
Sexo	V=M	V>M
Obesidad	Infrecuente	Frecuente
Hipertrofia Adenoamigdalares	Frecuente	Infrecuente
Hipersomnias Diurnas	Infrecuente	Muy frecuente
Arquitectura Del Sueño	Normal	Alterada
Duración De Apneas Patológicas	Variable	>10 segundos
Índice Apneas Patológicas	>1	>5
Despertares	Infrecuentes	Frecuentes
Comportamiento Diurno	Hiperactividad	Trastornos cognitivos
Tratamiento Quirúrgico	AA	UPFP
Tratamiento Médico	CPAP ocasional	CPAP

AA: adenoamigdalectomía, CPAP: presión positiva continua en vía aérea, M: mujeres, UPFP: uvulopalatinofaringoplastia, V: varones.

3.3.1 Definición

Es un trastorno respiratorio durante el sueño caracterizado por una obstrucción parcial prolongada de la vía aérea superior, y/o una obstrucción completa intermitente (apnea

obstructiva), que interrumpe la ventilación normal durante el sueño y altera los patrones del sueño normal^{30,31}.

El diámetro de las vías respiratorias superiores durante la respiración se mantiene en función de un equilibrio entre dos fuerzas opuestas: la presión negativa inspiratoria que produce el colapso de los tejidos hacia el interior y la acción de los músculos dilatadores de la faringe, que lo contrarresta. Este equilibrio es más frágil en el niño durante el sueño debido a que durante la vigilia, la actividad de los músculos dilatadores de las vías respiratorias superiores mantiene la fuerza de apertura necesaria para conservarlas abiertas, pero durante el sueño, la disminución de la actividad de estos músculos produce la obstrucción parcial (hipopnea) o total (apnea). El factor anatómico más importante es la hipertrofia adenoamigdalar y el factor funcional de mayor interés es la hipotonía faríngea en fase REM (tabla 6). Pero la hipertrofia adenoamigdalar, por sí sola, no es suficiente para producir SAOS y tampoco hay una correlación entre el tamaño adenoamigdalar y la gravedad del SAOS, así también, muchos niños con importante hipertrofia no padecen trastornos respiratorios del sueño.

Tabla 6. Factores predisponentes del SAOS en el niño³².

Hipertrofia de amígdalas y adenoides
Malformaciones congénitas craneofaciales: síndrome de Down, síndrome de Pierre-Robin, síndrome de Treacher-Collins, síndrome de Klippel-Feil, síndrome de Prader-Willi, acondroplasia, etc
Obstrucción nasal marcada
Laringomalacia
Enfermedades neurológicas y neuromusculares
Reflujo gastroesofágico
Obesidad

3.3.2 Epidemiología

A pesar de que la prevalencia de su síntoma principal, el ronquido, es del 10-12%, la del SAOS oscila entre el 2-3%^{33,34}. El pico de prevalencia se produce entre los 2 y 8 años, que es cuando la hipertrofia del tejido linfoide alcanza su mayor tamaño.

3.3.3 Clínica

El síntoma guía es el ronquido; su ausencia prácticamente descarta la existencia de SAOS, pero su presencia no indica necesariamente la existencia del mismo. Hablamos de **ronquido primario** o **ronquido simple** cuando éste no se acompaña de alteraciones polisomnográficas (apneas-hipopneas, desaturaciones, hipercapnias o fragmentación del

sueño). Aunque el ronquido primario normalmente se considera benigno, faltan estudios para determinar si puede progresar a largo plazo a SAOS²⁹. La clínica del SAOS se resume en la tabla 7.

Tabla 7. Manifestaciones clínicas del SAOS en niños³².

<p>Síntomas nocturnos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ronquidos - Respiración ruidosa/difícil - Pausas respiratorias - Sueño intranquilo - Respiración bucal - Posturas anormales con hiperextensión de la cabeza - Sudoración profusa - Enuresis <p>Síntomas diurnos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cefalea matutina - Hipersomnia a veces - Hiperactividad, déficit de atención - Bajo rendimiento escolar - Cansancio - Retraso del desarrollo ponderoestatural <p>Síntomas relacionados con la hipertrofia adenoamigdal</p> <ul style="list-style-type: none"> - Respiración bucal - Sequedad de boca/halitos - Congestión nasal - Infecciones frecuentes de vías respiratorias altas - Alteraciones del habla

Los casos no tratados pueden desarrollar complicaciones graves como retraso en el desarrollo, cor pulmonale y retraso mental.

3.3.4 Diagnóstico

Además de la historia clínica y la exploración física, contamos con la pulsioximetría y la polisomnografía. La **polisomnografía (PSG)** nocturna es la única técnica diagnóstica que cuantifica las anomalías ventilatorias y del sueño, asociadas con los trastornos respiratorios del sueño. Puede hacerse a cualquier edad y es el "Gold Standard" de las técnicas diagnósticas. Actualmente los criterios diagnósticos del SAOS no están bien definidos, pero para la *American Thoracic Society* un índice de apnea-hipopnea (IAH) >1 a la hora es diagnóstico de SAOS. La **pulsioximetría** nocturna puede ser útil si demuestra un patrón de desaturaciones cíclicas. Una pulsioximetría nocturna con tres o más desaturaciones < 90% tiene hasta un 97% de valor predictivo positivo para SAOS en niños sin otro problema de salud³⁵. Si la oximetría es negativa es preciso realizar una polisomnografía para el diagnóstico de certeza. Otras técnicas, como audiograbaciones y

videograbaciones en el hogar, necesitan más estudios sobre su sensibilidad y especificidad.

3.3.5 Tratamiento

La **adenoamigdalectomía (AA)** es el tratamiento de elección del SAOS infantil dado que la hipertrofia adenoamigdalares es el factor anatómico que más predispone a sufrir esta entidad. Respecto a la AA, en una reciente revisión Cochrane³⁶ los autores concluyen que es útil en el tratamiento del SAOS infantil, pero los médicos y padres deben sopesar los beneficios y riesgos de la AA frente a una actitud expectante en estos niños. La AA ha demostrado resolver los trastornos respiratorios^{37,38} y síntomas nocturnos³⁹ en el 75-100% de los niños sin otra patología de base y se considera el tratamiento de primera elección en niños con rasgos craneofaciales normales. La adenoidectomía sola puede no ser suficiente⁴⁰. Es importante tener en consideración el riesgo postquirúrgico en niños con SAOS, sobre todo, SAOS grave, menores de 3 años y con enfermedades médicas concomitantes.

La **uvulopalatofaringoplastia**, a diferencia del adulto, es una técnica poco utilizada en niños. Se aplica en enfermedades neuromusculares, parálisis cerebral y accidentes cerebrovasculares. La traqueotomía se usa en déficit neurológicos y anomalías craneofaciales graves. Los tratamientos de ortodoncia corrigen las anomalías maxilomandibulares.

La **presión positiva continua en vía aérea (CPAP)** ha demostrado ser un dispositivo seguro para tratar el SAOS infantil. Se utiliza en anomalías craneofaciales, trastornos neuromusculares, síndromes genéticos, displasias óseas y obesidad que no curan tras la AA, y es una alternativa a la traqueotomía.

Por último, se han demostrado beneficios de los **corticoides tópicos nasales**⁴¹ y de los **antagonistas de los receptores de leucotrienos**^{42,43}, como el montelukast.

4. AMIGDALECTOMÍA

4.1 Definición e historia

La amigdalectomía es el acto quirúrgico de extirpar las amígdalas palatinas. La primera referencia escrita la encontramos en *Aulio Cornelio Celso*, escritor romano de principios del siglo I dC cuya gran obra “De Res Médica” fue descubierta durante el pontificado del papa Nicolás V en el siglo XV. En ella se describe la técnica de amigdalectomía mediante un escalpelo y disección con el dedo, describiendo además la cápsula que recubre la amígdala y recomendando la aplicación postoperatoria de vinagre para prevenir y detener las hemorragias. En el volumen VI afirma: “es de recomendar el arrancamiento de las amígdalas, porque el gran desarrollo de ellas provoca trastornos de la deglución, audición, voz, respiración y estado general”.

Aetius de Amida (502-575 dC), en su “Contractae ex veteribus medicinae tetrabiblos”, describe la forma de disección amigdalares mediante un cuchillete y un gancho y hace mayor hincapié en los problemas hemorrágicos que no fueron debidamente valorados hasta ese momento.

En el año 750 dC, *Paulus Aegineta* (Pablo de Egina) no aprueba la operación de las amígdalas cuando se hallen inflamadas y describe los medios que cree más convenientes para extirparlas cuando “son pálidas, contraídas y de base estrecha (pediculadas)”.

En el año 1120 *Abul Kasim Ben Abbas Az Zahrani*, nacido en Azara (Córdoba) a finales del siglo X, escribió una gran obra, el “Al Tesrif o Exposición de las Materias”, donde profundiza en el conocimiento de la anatomía faríngea, mostrándose temeroso por las complicaciones de la amigdalectomía. De esta manera, la amigdalectomía queda relegada en el casi total olvido durante la Edad Media europea, para resurgir con ímpetu con la llegada de la cirugía moderna.

En el año 1509 *Ambrosio Paré*, el más grande precursor de la cirugía moderna, recomienda nada menos que la traqueotomía en casos de gran hipertrofia amigdalares, traqueotomía seguida de estrangulación de las tonsilas mediante la ligadura.

Es el famoso cirujano *William Cheselden* (1688-1752) quien recomienda una técnica de estrangulación mediante un resorte con dos hilos que pasan por una aguja, luego perfeccionado por su discípulo *Samuel Sharp*, quienes hacen hincapié en la ligadura como prevención de la hemorragia.

En 1825, *Phillip Syng Physick*, el padre de la cirugía norteamericana, ideó el primer tonsilotomo o guillotina amigdalár tras estudiar con detenimiento los instrumentos ideados por Sharp y Benjamin Bell, y motivado por el pavor a la hemorragia secundaria a la cirugía. Este instrumento fue el método favorito de extirpación amigdalár hasta el final del siglo XIX.

En 1870, *MacKenzie* simplificó mucho el instrumental, dejando más campo quirúrgico y por tanto facilitando su manejo, por lo que se comenzó a popularizar su uso para niños pequeños.

Ballenger, a principios del siglo XX, llegó a la extirpación extracapsular total por disección, gracias a su habilidad quirúrgica y al uso del fórceps para la tracción de la amígdala. Este procedimiento llegó a adquirir gran boga en América, hasta el punto de relegar casi por completo el uso de la guillotina.

Gracias a las modificaciones que *Greenfield Sluder* hizo a la guillotina de Physick, vuelve a ponerse de moda el uso de la guillotina. Su trabajo en 1923 tuvo tal aceptación, que esta técnica viene empleándose hasta nuestros días.

Cabe decir que todas estas técnicas no conseguían la extracción completa de las amígdalas, sino que se realizaban únicamente amigdalectomías parciales. Esto se debía no sólo al material quirúrgico rudimentario o a defectos de la técnica quirúrgica per se, sino también a la inexistencia de analgesia y anestesia, con el consiguiente movimiento del paciente. Es por ello por lo que la introducción de las guillotinas fue crucial, puesto que permitían una amigdalectomía casi completa en el menor tiempo posible.

La primera amigdalectomía por disección que se realizó bajo anestesia general con gas éter parece ser que fue realizada por *Crowe* en el John Hopkins Hospital en 1917. Este cirujano fue el creador del abre bocas llamado más tarde de Crowe-Davis, necesario para retraer la lengua e introducir el anestésico. No fue hasta casi finales de siglo en que se impuso definitivamente la amigdalectomía por disección bajo anestesia general.

En la actualidad, principios del s. XXI, probablemente los retos de la cirugía de la amígdala se encuentren en la disminución del dolor postoperatorio, del sangrado intraoperatorio y la prevención de complicaciones quirúrgicas mediante el uso de las nuevas técnicas que van apareciendo, como el bisturí armónico y la radiofrecuencia⁴⁴.

4.2 Indicaciones

Las indicaciones de la amigdalectomía han variado bastante a lo largo de la historia. Lógicamente, en la era preantibiótica, la amigdalectomía se reveló como un arma terapéutica muy efectiva tanto para la curación como para la prevención de las complicaciones de las infecciones amigdalares, como la glomerulonefritis postestreptocócica y la fiebre reumática. Pero posteriormente, cuando el uso de antibióticos estaba ya plenamente instaurado, siguieron llevándose a cabo amigdalectomías de forma masiva por indicaciones muchas veces peregrinas como pérdida de apetito, retrasos en el crecimiento, etc... Llegándose a realizar en EEUU, 1'4 millones de amigdalectomías solo en el año 1949.

Glover publicó un artículo⁴⁵ en el año 1938 sobre las tasas de amigdalectomía en la edad escolar entre distritos vecinos del Reino Unido. En algunos distritos la tasa era casi seis veces superior a la tasa media, en otros era hasta ocho veces superior a la del vecino y la probabilidad de extirpar las amígdalas llegaba a ser 27 veces mayor en un condado que en otro. Además, no encontró correlación entre la tasa de amigdalectomía y el hacinamiento, el desempleo, la eficiencia del servicio dental escolar, la urbanización, el clima o la nutrición. La trascendencia que tuvo este estudio entre la comunidad científica vino por el hecho de haber detectado una amplia variación en las tasas de cirugía amigdalares según el área geográfica observada, en una época en la que la amigdalectomía se ejecutaba de una forma prácticamente sistemática, casi como una medida habitual de salud pública.

La falta de evidencia científica que apoyara esta cirugía, hizo que a partir de la década de 1970 se cuestionaran las indicaciones.

El primer estudio aleatorizado que encontramos en la bibliografía es el de **Paradise et al**⁴⁶. en el año 1984, donde demuestran los beneficios de la cirugía de manera significativa, en comparación con el tratamiento antibiótico, sólo durante los 2 primeros años siguientes a la intervención y en niños que reunían unos estrictos criterios de selección (tabla 8), por lo que no se podía generalizar a otros niños que presentaran menor severidad ni a la población adulta.

Tabla 8. Indicaciones de cirugía según Paradise et al⁴⁶.

Criterion	Definition
Age	3–15 years
Number of tonsillitis episodes	≥7 episodes during the previous year or ≥ 5 episodes per year during the previous 2 years or ≥3 episodes per year during the previous 3 years
Episodes – definition: sore throat and at least one of the four criteria	1. Body temperature >38.3°C 2. Cervical lymphomas (pain on pressure or >2 cm) 3. Tonsillar exudation 4. Confirmed β-hemolytic streptococci A
Previous treatment	Antibiotics against streptococci in each episode
Documentation	Each episode was documented by a physician or a physician has observed 2 episodes in person

Las guías americanas y europeas de amigdalectomía se basan actualmente en estos “criterios Paradise”.

En 2002, Paradise⁴⁷ et al. concluyeron que los modestos beneficios de la amigdalectomía o AA en niños afectados de forma moderada con FAA recurrentes, no justificaban los riesgos inherentes, la morbilidad y los costes de la operación. **Van Staaij**⁴⁸ et al. en 2004 afirman que la AA no tiene mayores beneficios respecto a una actitud expectante, en niños con síntomas leves de FAA o hipertrofia adenoamigdal, y señalan la presión de los padres por operar. Hay que tener en cuenta que la AA es una intervención quirúrgica que goza de un gran prestigio social entre la población y un buen número de padres y madres consideran que es útil para disminuir las infecciones respiratorias agudas de sus hijos. Un estudio reciente⁴⁹ intenta explicar las razones por las que, a pesar de la falta de evidencia clínica sólida de la eficacia de la amigdalectomía, los padres se muestran satisfechos con la cirugía, encontrando una discrepancia entre resultados objetivos (número de episodios de dolor de garganta) y subjetivos (calidad de vida).

En la actualidad, en EEUU, han pasado de realizar casi 2 millones de intervenciones anuales en la década de 1960, a 400.000 al año, lo que supone un descenso del 80% en los últimos 20 años.

Las 2 indicaciones principales de amigdalectomía en la edad infantil son la hipertrofia amigdal y la amigdalitis recurrente^{50,51}. A continuación se detallan las indicaciones que se han consensuado a pesar de que sigue existiendo controversia^{44,52}.

INDICACIONES ABSOLUTAS

- 1) *Cáncer amigdalár.*
- 2) *Obstrucción grave de la vía aérea en la orofaringe por hipertrofia amigdalár.*
- 3) *Hemorragia amigdalár persistente.*

INDICACIONES RELATIVAS

4) *Amigdalitis de repetición o recurrentes:*

- 7 o más episodios de amigdalitis aguda al año en el último año o,
- 5 episodios al año en los últimos dos años o,
- 3 episodios al año en los últimos tres años.
- Síntomas persistentes durante al menos un año.

Además, cada episodio debe cumplir al menos uno de estos criterios:

- Exudado purulento amigdalár.
- Fiebre mayor de 38°.
- Linfadenopatías cervicales anteriores.
- Cultivo faríngeo positivo para estreptococo β -hemolítico del grupo A.

Estos criterios son los denominados mínimamente aceptables, pero cada caso debe ser evaluado individualmente sopesando los siguientes factores:

- Los episodios de amigdalitis son incapacitantes e impiden el desarrollo normal de las actividades del niño.
- Tratamiento adecuado en cada episodio.
- Los episodios de amigdalitis trastornan la vida familiar y laboral de los padres.
- La curva de crecimiento del niño se estanca sin otra razón que lo explique.
- Los episodios de amigdalitis deberían estar documentados en la historia clínica del paciente. Si no es así, y la historia clínica ofrece dudas, se hará un seguimiento durante 6 meses para confirmar el patrón clínico y considerar la indicación de la operación.

5) *Adenitis cervical recurrente:* se define como la repetición del siguiente cuadro clínico con la misma frecuencia considerada para la amigdalitis recurrente y con las mismas consideraciones a la hora de evaluar estos casos:

- Inflamación aguda de adenopatías cervicales múltiples.
- Fiebre superior a 38° y malestar general.
- Más de 3 días de duración.
- Ausencia de infección respiratoria baja.
- Coexistencia de infección respiratoria alta o amigdalitis aguda.

6) *Absceso periamigdalino recurrente*. Un primer episodio de absceso periamigdalino no es indicación de amigdalectomía.

No se considera indicada la amigdalectomía para tratar⁴⁴:

- Trastornos del desarrollo pónderoestatural.
- Maloclusión dental o alteraciones del desarrollo facial.
- Halitosis persistente.
- Trastornos de masticación o disfagia, siempre y cuando éstos no asocien obstrucción sintomática de la vía aérea.

Una revisión bibliográfica reciente⁵³ de las indicaciones de amigdalectomía según el nivel de evidencia, destaca la ventaja, a corto plazo, de la tonsilotomía respecto a la tonsilectomía en niños con SAOS⁵⁴ y la tendencia actual de sugerir amigdalectomía en niños con psoriasis guttata, así como en el tratamiento de la nefropatía IgA, pero se necesitan más estudios a gran escala.

Respecto a las técnicas quirúrgicas que pueden emplearse hay varias: la disección fría (la más conocida y usada) con disector romo, bisturí frío o mediante tijeras, la disección con electrocauterio o bisturí eléctrico, el láser, el bisturí armónico, microdebridador y la radiofrecuencia o ablación fría por plasma (coblation o plasma fision).

4.3 Contraindicaciones

No existen evidencias actuales de la existencia de contraindicaciones para la amigdalectomía. Los procesos intercurrentes (coagulopatías, metabolopatías, infecciones, etc.) pueden ser controlados y/o corregidos con objeto de permitir una intervención segura. Se aconseja esperar al menos 3 semanas tras la última infección aguda para reducir el riesgo de hemorragia⁵². La *amigdalectomía de Quinsy*, o amigdalectomía en caliente del absceso periamigdalino, es una opción muy controvertida y que en principio se reserva para casos seleccionados.

La alteración en la función del paladar sería una contraindicación de la cirugía: fisura palatina evidente o submucosa, patología neurológica o neuromuscular que afecte la función del paladar y/o faringe⁵². Se debe realizar una evaluación preoperatoria del riesgo hemorrágico y respiratorio.

Determinadas condiciones clínicas del paciente no aconsejan la cirugía en régimen ambulatorio⁵⁵:

- Edad inferior a 3 años.
- Enfermedades sistémicas graves.
- Malformaciones corporales, especialmente las craneofaciales que afectan a la vía aérea.
- La obesidad mórbida.

4.4 Complicaciones

Las principales *complicaciones primarias* son las respiratorias, las náuseas y vómitos postoperatorios y la hemorragia. La hemorragia es la complicación inmediata más común y suele ocurrir dentro de las primeras seis horas, el tiempo mínimo de vigilancia recomendado después de una cirugía ambulatoria. En casos severos puede requerir la ligadura de la carótida externa.

Las principales *complicaciones tardías* son la hemorragia tardía, disfagia dolorosa que puede inducir riesgo de deshidratación por rechazo a alimentos y obstrucción respiratoria persistente.

Otras complicaciones son⁵³:

- Edema de la úvula palatina o traumatismo.
- Trauma dental, quemadura superficial (lengua o comisura de los labios), cicatriz velar o velofaríngea.
- Bronconeumopatía y absceso pulmonar por inhalación.
- Subluxación C1-C2 (o síndrome de Grisel) por extensión forzada del cuello.
- Enfisema cervical subcutáneo debido a la herida de la mucosa faríngea.
- Alteración de la voz, insuficiencia velar transitoria o definitiva.
- Disgeusia.
- Estenosis velofaríngea.

Afortunadamente las complicaciones serias de la amigdalectomía son escasas.

5. SUSTANCIA P Y RECEPTOR NEUROKININA 1

5.1 Taquicininas (TK)

Las TK representan la familia de neuropéptidos más grande conocida y una de las más estudiadas. Están ampliamente distribuidas en el reino animal, desde invertebrados (insectos, gusanos, moluscos) hasta los mamíferos. Durante muchos años se pensó que tenían exclusivamente un origen neuronal, pero hoy se sabe que están presentes en diferentes tejidos de diversas especies animales (piel, tracto gastrointestinal, sistema nervioso, etc).

Los **neuropéptidos** (NP) son péptidos formados por la unión de aminoácidos. Constituyen el mayor grupo de sustancias para la comunicación celular, bien actuando como neurotransmisores (en las sinapsis químicas entre neurona y neurona), neuromoduladores (son capaces de modificar la acción de otros neurotransmisores) o neurohormonas (actuando a distancia una vez liberados al torrente sanguíneo o al líquido extracelular). En general, un neuropéptido concreto puede actuar como neurotransmisor en una sinapsis y poseer acciones moduladoras u hormonales (acciones paracrinias) en otros lugares próximos o distantes, que posean receptores para esta sustancia.

Se han localizado NP tanto en los cuerpos celulares como en las proyecciones de neuronas, y se ha comprobado que su localización es discreta y característica de cada uno de ellos, tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en la periferia⁵⁶. Muchos NP que se presentan en el cerebro existen también en el tracto gastrointestinal, donde actúan como hormonas o neurotransmisores periféricos; de hecho, algunos se descubrieron inicialmente en tejidos viscerales y sólo más tarde se identificaron en las neuronas. Un buen ejemplo es la hormona gastrointestinal glucagón⁵⁷.

Se han realizado diversas clasificaciones de los NP que atienden a diferentes criterios, como la localización tisular, la estructura y la secuencia de aminoácidos, lo que ha permitido dividir a los NP en familias, en ocasiones, con funciones similares o incluso solapadas. En la tabla 9 se muestran los principales neuropéptidos de mamíferos y se incluyen algunos de los recientemente descubiertos. De entre ellos nos vamos a centrar en el grupo de las taquicininas, y en concreto, en la sustancia P, objeto de nuestro estudio.

Tabla 9. Principales neuropéptidos de mamíferos⁵⁸.

Hipotalámicos	Hormona liberadora de la tirotrópina (TRH) Somatostatina (SST) Hormona liberadora de la corticotropina (CRH) Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) Hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) Orexinas A y B (hipocretinas 1 y 2)
Hipofisarios	Vasopresina ^a Oxitocina ^a Hormona adrenocorticotropa (ACTH) Hormona estimuladora de melanocitos Prolactina Hormona de crecimiento (GH) Hormona estimulante del folículo (FSH) Hormona luteinizante (LH) Hormona estimulante del tiroides Secretoneurina
Péptidos gastrointestinales y pancreáticos	Polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) Colecistocinina (CCK) Gastrina Insulina Glucagón Motilina Amilina Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) Galanina Secretina Neuropéptido Y Polipéptido pancreático Péptido tirosina-tirosina
Péptidos opioides	Metencefalina (Met-Enk) Leu-encefalina (Leu-Enk) Dinorfina B-endorfina
Taquicininas	Sustancia P Neurokinina A Neurokinina B Neuropéptido K
Otros	Angiotensina II Bombesina Brdicininina Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) Neurotensina Neuropéptido FF Péptido natriurético cerebral
Nuevos	Péptido regulador de la cocaína y anfetaminas Endomorfina 1 y 2 Nociceptina/Orfanina Nocistatin Péptido liberador de prolactina Urocortina Cortistatina Apelina

a: Neuropéptido producido en el hipotálamo pero almacenado en la neurohipófisis

La primera TK descubierta fue la **Sustancia P** (SP) en el año 1931, por Von Euler y Gaddum⁵⁹ a partir de cerebro e intestino de caballo y se encontró que causaba vasodilatación y estimulaba la motilidad intestinal en conejos. Supuso el punto de partida para una larga historia de investigación en este campo. Hubo que esperar 40 años hasta lograr su purificación y caracterización química^{60,61}. En la década de los 80 se aislaron en

la médula espinal de cerdo otras TK semejantes a la SP, la **neurokinina A** (NKA)^{62,63} y la **neurokinina B** (NKB)⁶⁴. Posteriormente, se descubrieron en cerebro porcino el **neuropéptido K** (NPK)^{63,65} y, en intestino de conejo el **neuropéptido γ** (NP γ)⁶⁶, ambas formas elongadas de la NKA. En el año 2000 se encontró una nueva TK en el ratón con actividad reguladora de la linfopoyesis B y que se expresaba principalmente en tejido no neuronal, a la que se llamó **hemokinina-1** (HK-1)⁶⁷. El hallazgo de la HK-1 dio paso a la descripción de un nuevo grupo de TK, las **endokininas**⁶⁸, con una estructura variable entre diferentes especies animales.

Durante muchos años, las TK se consideraron casi exclusivamente péptidos de origen neuronal que realizaban su acción a nivel periférico mediante su liberación desde terminaciones nerviosas. Clásicamente las terminaciones nerviosas sensibles a capsaicina eran la principal fuente de TK a nivel periférico. Hoy en día se sabe que existen otras fuentes neuronales y no neuronales que originan las TK⁶⁷.

El descubrimiento de las TK en vertebrados no mamíferos se remonta a la década de los 40, momento en que se aisló en una especie de pulpo mediterráneo una sustancia desconocida, que posteriormente sería conocida como **eledoisina**, con capacidad para disminuir la presión sanguínea, contraer la musculatura lisa intestinal y estimular la salivación de una forma profusa en perros y ratas⁶⁹. En invertebrados, tras varias décadas de investigación, se confirmó la existencia de estos péptidos en estructuras nerviosas de la langosta migratoria⁷⁰ y en glándulas salivares de una especie de mosquito⁷¹.

La estructura primaria de las TK se encuentra bastante conservada entre diferentes especies animales, tanto vertebrados como invertebrados, lo que sugiere una fuerte presión selectiva a lo largo de la evolución, en la que las mutaciones que implican cambios conservadores en la secuencia de aminoácidos favorecerían su supervivencia evolutiva⁷².

5.1.1 Estructura de las TK de mamíferos

Las TK de mamíferos poseen, por un lado, una secuencia común en el extremo carboxi-terminal (**Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂**), donde X es siempre un residuo hidrofóbico ya sea un grupo aromático (Tyr o Phe) o alifático (Val o Ile) y, por otro lado, una secuencia amino-terminal variable. De forma característica, todas las TK son aminopéptidos, es decir, presentan un grupo amino (NH₂) en la metionina carboxi-terminal. La amidación de la metionina terminal es esencial en su funcionamiento, y por ello los péptidos

tachykinin-like de los invertebrados, con una arginina en el C-terminal, son incapaces de activar los **receptores taquicinérgicos** (RTK) de mamíferos. Esta región C-terminal es esencial para la interacción y activación del receptor taquicinérgico^{73,74}, mientras que el extremo amino-terminal proporciona la especificidad de las TK frente al subtipo de receptor⁷⁵, así la SP muestra mayor afinidad por **NK1R**, la NKA por **NK2R** y la NKB por **NK3R** (tabla 10).

Tabla 10. Secuencias de los aminoácidos de las TK y péptidos relacionados con el gen de las TK (modificado de Steinhoff et al., 2014⁷⁶).

TAQUICININAS	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS ^a
Péptidos derivados de <i>Tac1</i> Sustancia P (SP): 11 aa Neurokinina A (NKA): 10 aa Neuropeptido K (NPK): 36 aa Neuropeptido γ (NP γ): 21 aa	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln- Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ His-Lys-Thr-Asp-Ser- Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH₂ Asp-Ala-Asp-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Gln-Val-Ala-Leu-Leu-Lys-Ala-Leu-Tyr-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser- Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH₂ Asp-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser- Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH₂
Péptidos derivados de <i>Tac3</i> Neurokinina B (NKB): 10 aa	Asp-Met-His-Asp-Phe- Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH₂
Péptidos derivados de <i>Tac4</i> <u>Humanos</u> Hemokinina-1 (HK-1): 11 aa Hemokinina-1 (4-11): 8 aa Endokinina A (EKA): 47 aa Endokinina B (EKB): 41 aa Endokinina C (EKC) ^b : 14 aa Endokinina D (EKD) ^b : 14 aa <u>Ratones</u> Hemokinina-1 (HK-1): 11 aa	Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln- Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ Ala-Ser-Gln- Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ Asp-Gly-Gly-Glu-Glu-Gln-Thr-Leu-Ser-Thr-Glu-Ala-Glu-Thr-Trp-Val-Ile-Val-Ala-Leu-Glu-Glu-Gly-Ala-Gly-Pro-Ser-Ile-Gln-Leu-Gln-Leu-Gln-Glu-Val-Lys-Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln- Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ Asp-Gly-Gly-Glu-Glu-Gln-Thr-Leu-Ser-Thr-Glu-Ala-Glu-Thr-Trp-Glu-Gly-Ala-Gly-Pro-Ser-Ile-Gln-Leu-Gln-Leu-Gln-Glu-Val-Lys-Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln- Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ Lys-Lys-Ala-Tyr-Gln-Leu-Glu-His-Thr-Phe-Gln-Gly-Leu-Leu-NH ₂ Val-Gly-Ala-Tyr-Gln-Leu-Glu-His-Thr-Phe-Gln-Gly-Leu-Leu-NH ₂ (Arg)-Ser-Arg-Thr-Arg-Gln- Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH₂

^a Los aminoácidos en azul son los que conforman la secuencia C-terminal común de las TK. En negrita se representa el residuo aromático o alifático correspondiente. ^b Péptido relacionado con las TK (*tachykinin-like*). Las EKC y EKD no son TK, la secuencia C-terminal está ausente, aunque deriven del gen *Tac4*. La existencia de un residuo de arginina en el amino-terminal de los ratones es discutible.

5.1.2 Genes de las TK

Tres genes codifican las TK: *Tac1* (clásicamente denominado Pre-pro-taquicinina-A, *Ppt-a*), *Tac3* (*Ppt-b*) y *Tac4* (*Ppt-c*). *Tac1* codifica la SP, NKA, NPK y NP γ ; *Tac3* codifica solo la NKB; y *Tac4* codifica la HK-1, EKA, EKB, EKC y EKD. Aunque *Tac2* fue inicialmente asignado como gen codificante del precursor de la NKA, posteriormente se descubrió que era idéntico al *Tac1*. En todos los casos, a partir de cada gen, y por acción de la ARN polimerasa II, se genera un transcrito primario de ARNm que sufrirá transformaciones de corte y empalme para dar lugar a nuevos transcritos más cortos, con distintas combinaciones de los exones originales^{77,78} (figura 17).

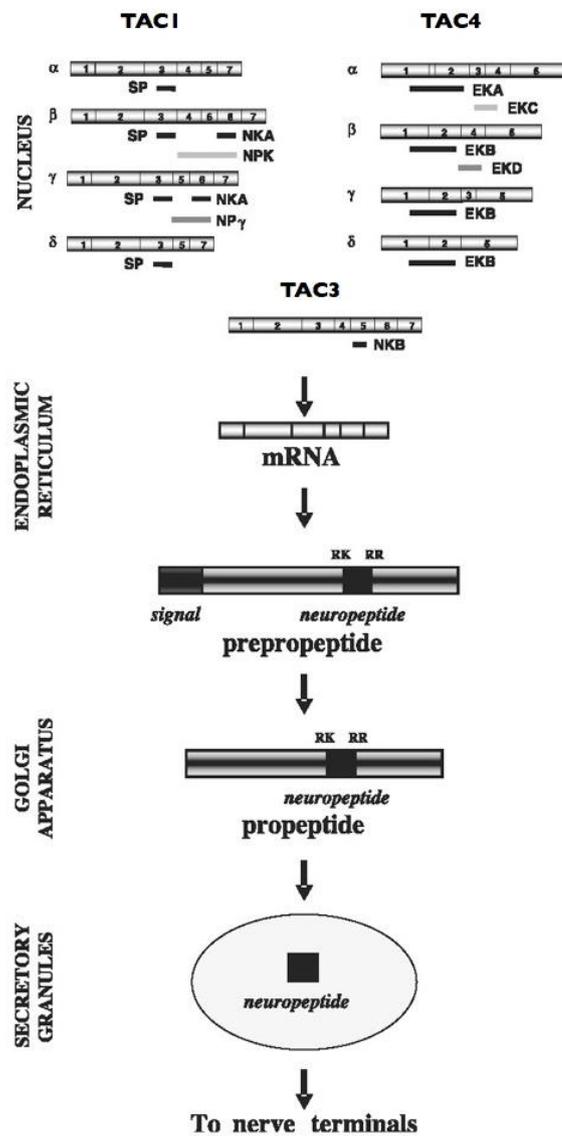


Figura 17. Esquema del proceso general de síntesis neuronal de las TK a partir de los genes *Tac1*, *Tac3* y *Tac4* (Modificado de Pennefather et al., 2004⁷⁷).

La traducción del ARNm maduro, genera un largo polipéptido llamado **prepropéptido**, que consiste en un péptido señal, una o varias copias de neuropéptido, y una o varias partes espaciadoras. El péptido señal permite la unión e introducción del precursor en el retículo endoplasmático, para posteriormente ser eliminado, generándose el **propéptido**. Éste, a su vez, es transportado al aparato de Golgi, donde los espaciadores son eliminados, quedando el **péptido** activo final que es empaquetado en gránulos secretores para, en el caso de las neuronas, ser transportados a lo largo del axón hasta las terminaciones nerviosas.

El primer gen clonado a partir de cerebro bovino fue *Tac1*⁶³. En humanos, este gen está compuesto por siete exones y a partir de su transcripción primaria, mediante *splicing* (o empalme) se obtienen cuatro isoformas de ARNm (α , β , γ y δ) que difieren en la combinación de sus exones. Las variantes $\alpha Tac1$ y $\delta Tac1$ codifican la síntesis de SP, y las formas $\beta Tac1$ y $\gamma Tac1$ codifican la síntesis tanto de SP como NKA^{79,80,81}. Además, el NPK y el NPy son codificados a partir de la inclusión o exclusión del exón 4 de las variantes $\beta Tac1$ y $\gamma Tac1$, respectivamente^{65,66} (figura 18). Como consecuencia de este *splicing*, la SP puede expresarse de manera aislada, mientras que la NKA siempre se expresa acompañada de SP.

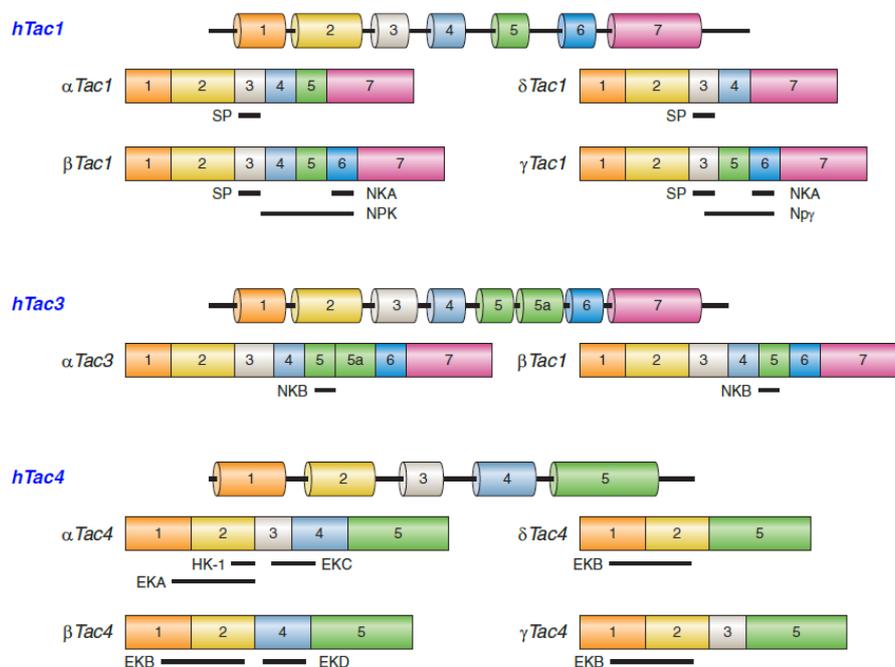


Figura 18. Estructura de los genes *Tac* humanos y las variantes de ARNm. Los productos peptídicos están indicados con barras negras horizontales bajo las estructuras de ARNm (imagen tomada de Steinhoff et al., 2014⁷⁶).

Se ha comprobado la expresión de *Tac1* en todos los tejidos humanos, especialmente en cerebro (adulto y fetal), corazón, bazo, colon, glándula mamaria^{68,82} y placenta⁸³. Las concentraciones en los diferentes tejidos de las isoformas γ y β , que expresan la SP y NKA, son las más abundantes en humanos.

El gen *Tac3* fue identificado por primera vez en bovinos como un gen que codificaba la NKB⁸⁴. Existen dos isoformas de *Tac3* (α y β) y ambas codifican una sola taquicinina, la NKB^{84,85}.

El gen *Tac4* fue descubierto por Zhang et al.⁶⁷ en el año 2000 a partir de células hematopoyéticas en ratones. Dicho gen codifica la hemokinina-1, denominada así por su clara expresión en médula ósea y su implicación en la maduración de células B en esta especie, mostrando una amplia distribución periférica no neuronal hasta entonces desconocida. En humanos este gen se caracterizó dos años más tarde⁸⁶ y difiere del de ratones en que contiene dos sitios potenciales de escisión monobásica en el extremo amino-terminal del predicho péptido HK-1. Así, el gen *Tac4* humano puede generar dos posibles péptidos: HK-1 y HK-1(4-11) (véase la tabla 10). Se han identificado cuatro isoformas de ARNm: α , β , γ y δ , que codifican las endokininas, llamadas así por su papel en tejidos endocrinos⁶⁸. EKA y EKB son formas extendidas de HK-1 y se consideran auténticas taquicininas, por lo que tienen acciones biológicas *SP-like* y pueden interactuar con NKR^{67,68}. Mientras que EKC y EKD^{68,87}, al carecer de la secuencia común de las TK, se consideran péptidos relacionados con las TK (*tachykinin-like*), por lo tanto, no son TK.

5.2 Receptores taquicinérgicos (RTK)

5.2.1 Estructura y localización de los RTK

Los receptores de las taquicininas pertenecen a la superfamilia de receptores de membrana acoplados a proteínas G de tipo 1 (**RAPG**) o *rodhopsin-like*. Este grupo de proteínas incluye un gran número de receptores de membrana que comparten el mismo esquema estructural: siete dominios hidrofóbicos transmembrana (TMD I-VII), tres bucles extracelulares (ECL 1, ECL 2 y ECL 3), tres bucles intracelulares (ICL 1, ICL 2 e ICL 3), un dominio extracelular amino-terminal y otro citoplasmático carboxi-terminal^{74,88,89} (figura 19). Por su estructura típica, también se les llama receptores de los siete dominios transmembrana.

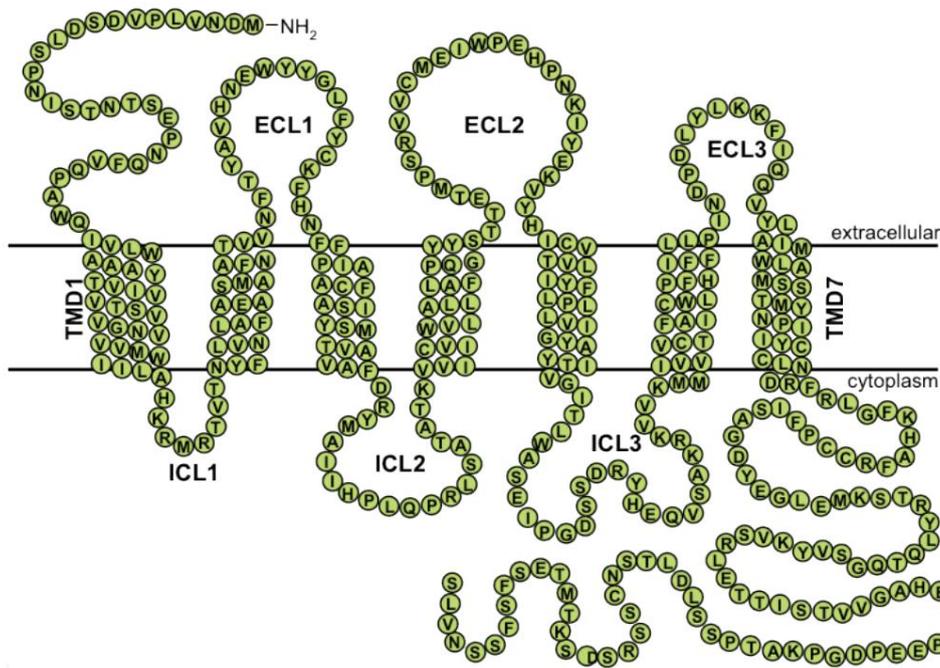


Figura 19. Estructura del NK1R humano (imagen tomada de Steinhoff et al., 2014⁷⁶).

Se han descrito 3 tipos: **NK1R** (receptor de la neurokinina 1), **NK2R** (receptor de la neurokinina 2) y **NK3R** (receptor de la neurokinina 3). El primer receptor clonado fue el NK1R⁹⁰ y pocos años después se lograron clonar varios RTK más^{91,92}. Los RTK han sido clonados en diferentes especies de mamíferos. En todos ellos, el NK1R es una proteína de 407 aminoácidos; en cambio, la estructura del NK2R (398 aminoácidos en humanos) y NK3R (465 aminoácidos en humanos) varía entre diferentes especies. Se propuso ampliar la clasificación de los RTK con el denominado NK4R, cuya farmacología es casi idéntica al NK3R, pero no se ha podido demostrar su origen en humanos⁹³.

Las taquicininas naturales pueden interactuar indistintamente con cualquiera de los tres receptores taquicinérgicos, aunque las mayores afinidades se observan entre NK1R y SP, NK2R y NKA, y NK3R y NKB^{72,77}. El NPK y NP γ , como formas elongadas de NKA que son, se unen con mayor preferencia a NK2R, aunque también poseen alta afinidad por NK1R^{94,95}. Tanto la HK-1 como la EKA y EKB presentan alta afinidad por el receptor NK1, con una potencia de activación similar a la SP, por lo que produce efectos casi idénticos a ésta a nivel periférico^{67,68,86,96}. En cambio, la EKC y la EKD, como se dijo anteriormente no muestran afinidad por los RTK⁶⁸.

Los RTK realizan sus acciones a través de la activación de una o más proteínas G: la unión de un agonista a su receptor específico en la superficie celular causa un cambio conformacional en éste que permite su interacción con la proteína G, formándose así un

complejo de alta afinidad: agonista-receptor-proteína G. Los mecanismos de señalización intracelular desencadenados por la unión de las taquicininas a sus receptores son complejos. Son muchas las posibles rutas de señalización que pueden ser activadas por los RAPG. Éstos son capaces de inducir respuestas que implican tanto las rutas mediadas por calcio (Ca^{++}) como por el adenosín monofosfato cíclico (AMPC). Tras la activación de la proteína G, se inicia una cascada de transducción de señales, que en el caso del NK1R, la ruta de transducción de señales clásica y más documentada, es la que se inicia con la fosfolipasa C (PLC), produciendo inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG), que actúan como segundos mensajeros, con posterior liberación de Ca^{++} y activación de la proteinquinasa C (PKC)⁹⁷. En la ruta del AMPC, éste se combina con la proteinquinasa A (PKA) actuando sobre el ADN y produciendo efectos a largo plazo sobre el metabolismo, crecimiento y diferenciación celular (figura 20). Para la activación de los RTK es fundamental su interacción con la región pentapeptídica carboxi-terminal común a las diferentes TK ya mencionada.

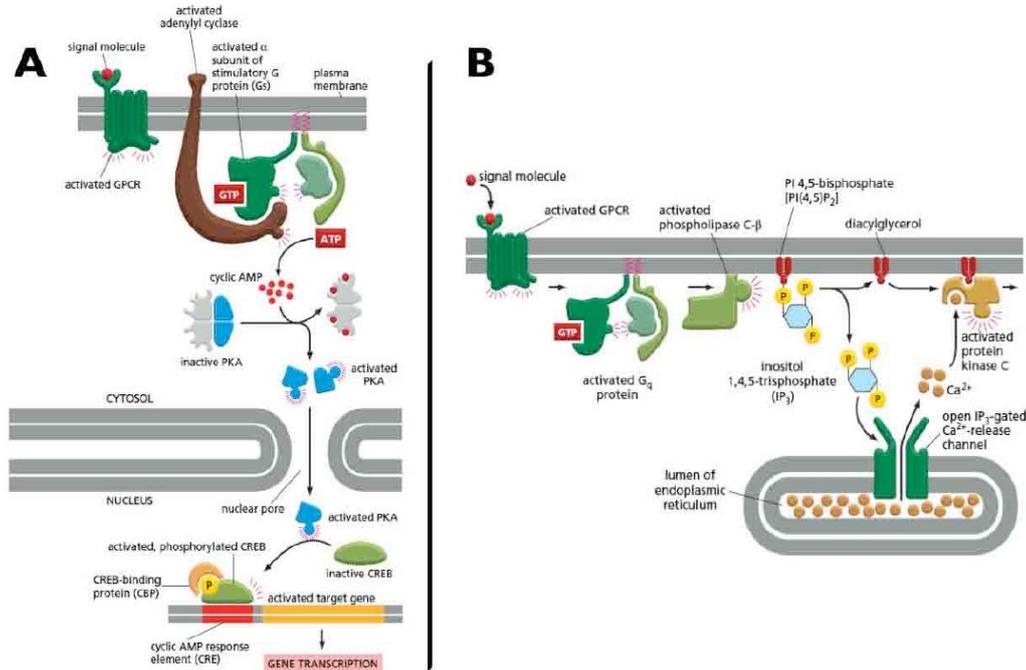


Figura 20. Mecanismos efectores de los receptores acoplados a proteína G. **A.** Vía de la adenilato ciclasa y proteinquinasa A (PKA). **B.** Vía del fosfatidil inositol bifosfato (imagen tomada de Alberts, 2015⁹⁸).

En mamíferos los receptores de las taquicininas se encuentran distribuidos dentro de cada especie de forma heterogénea. La expresión de NK1R es muy amplia tanto a nivel central

como periférico, habiéndose descrito en neuronas, células gliales, endotelio vascular, músculo y diferentes células del sistema inmune^{99,100,101,102,103,104}. En cambio, NK2R está presente principalmente en la periferia y de una manera muy selectiva en ciertos núcleos cerebrales^{104,105,106}. Por último, el NK3R se expresa sobre todo en el SNC, aunque también se ha visto en ciertos tejidos periféricos como placenta, útero, músculo esquelético, vena porta y mesentérica de la rata, pulmón, hígado y ciertas neuronas entéricas de diferentes especies^{104,107,108}.

5.2.2 Genes de los RTK

Los genes que codifican los receptores NK1R, NK2R y NK3R son *Tacr1*, *Tacr2* y *Tacr3*, respectivamente. Estos genes presentan una estructura similar entre ellos, distinguiéndose en cada uno de ellos cinco exones separados por intrones situados en idéntica posición⁷² (figura 21). La presencia de intrones es una característica poco habitual dentro de la familia de los RAPG¹⁰⁹. La combinación y los sitios de empalme de los diferentes exones puede dar lugar a variantes funcionales, cada una de ellas con una conformación y distinta afinidad por los ligandos endógenos, lo cual permite la potencial expansión de la familia de receptores taquicinérgicos sin la necesidad de contar con receptores adicionales¹¹⁰.

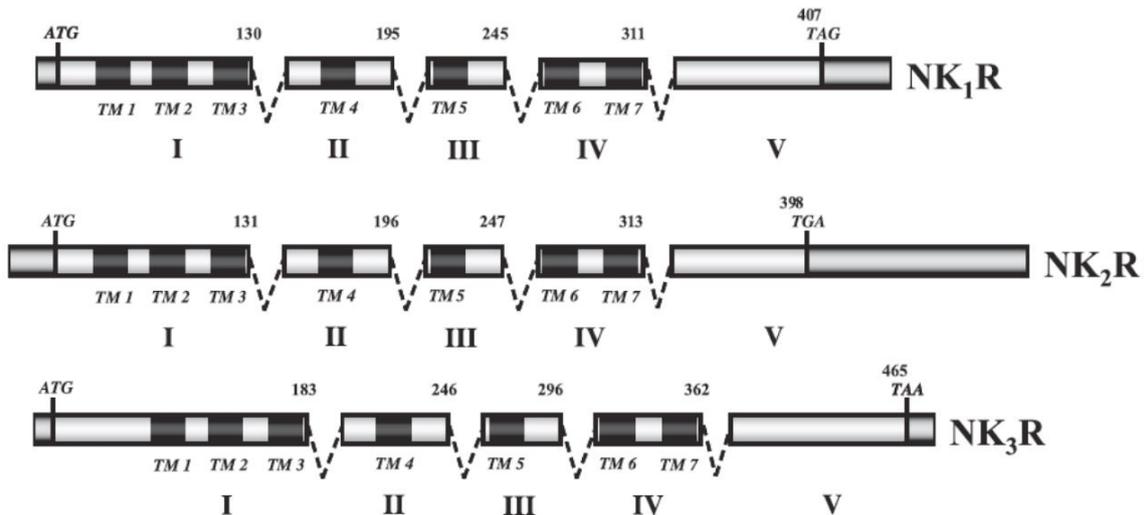


Figura 21. Representación esquemática de la organización de los genes que codifican los RTK humanos. Las regiones codificantes se dividen en cinco exones (I-V) separados por cuatro intrones (líneas discontinuas). Los segmentos transmembrana codificados por cada exón aparecen en negro e identificados con las letras TM (1-7). También se indican las posiciones de los aminoácidos en los lugares de *splicing* (imagen tomada de Pennefather et al., 2004⁷⁷).

5.3 Sustancia P

La SP, el primer miembro de la familia de péptidos de las TK, se ha llamado “neuropéptido pionero”, ya que el conocimiento adquirido gracias a los estudios de TK nos ha facilitado la comprensión de muchos neuropéptidos.

Como ya se ha comentado, la SP fue descubierta en el año 1931, cuando el profesor sueco **Von Euler** y el británico **Gaddum** trataban de encontrar acetilcolina en cerebro e intestino de caballo. En su lugar, descubrieron una sustancia resistente a la atropina que estimulaba el músculo liso y disminuía la presión sanguínea⁵⁹. Llamaron **Sustancia P** a este nuevo material, (P de *powder*, polvo en inglés) como referencia al polvo seco de acetona que quedaba en los extractos de los tejidos⁸⁵ (figura 22).

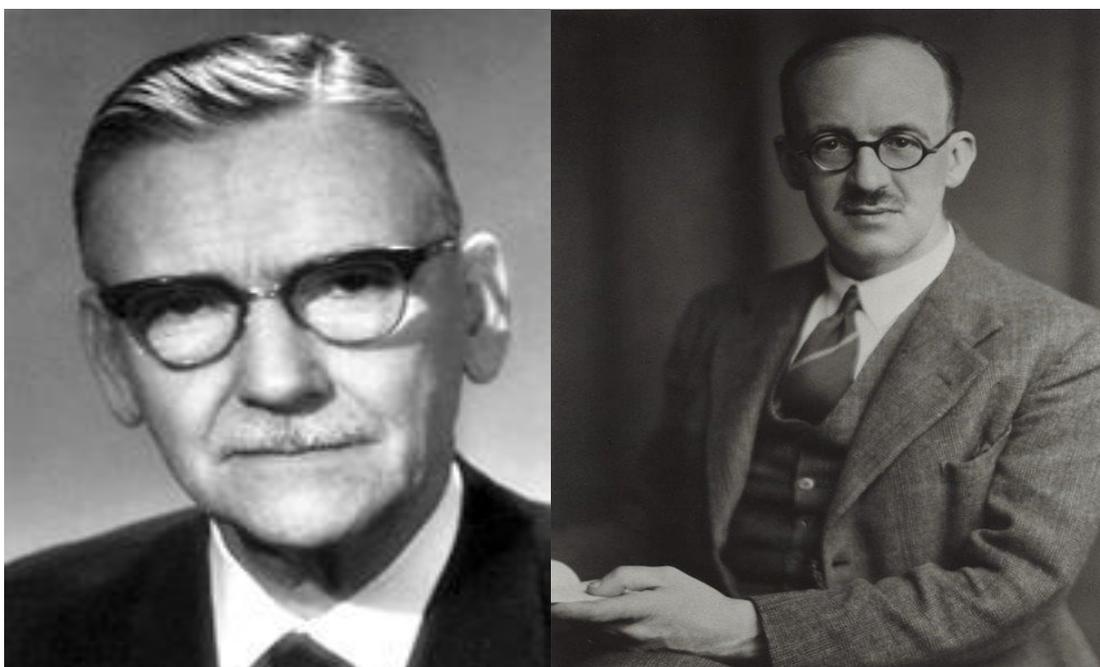


Figura 22. Dr. Ulf von Euler (1905-1983) a la izquierda (imagen tomada de nobelprize.org) y John Gaddum (1900-1965) a la derecha (imagen tomada de bps.ac.uk).

No fue hasta principios de los 70 en Boston, cuando **Susan E. Leeman** (figura 23) et al. identificaron la SP como un undecapéptido⁶¹, siendo los primeros en sintetizar el compuesto¹¹¹ y llevar a cabo un ensayo radioinmunológico¹¹². Todos estos avances permitirían la realización de numerosos estudios inmunohistoquímicos posteriores en tejidos de diferente localización, tanto animales como humanos.



Figura 23. Dra. Susan E. Leeman (1930-). Imagen procedente de *Boston University*.

La SP tiene una secuencia de 11 aminoácidos: Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂. Entre las características físico-químicas de la SP parcialmente purificada destaca que es soluble en agua y alcohol, pero insoluble en éter y cloroformo, resiste la ebullición a pH entre 1 y 7 pero se destruye rápidamente en medio alcalino, tiene un punto isoeléctrico cercano a 9 y durante la electroforesis en papel se desvía hacia el cátodo a pH < 10. Su actividad biológica es inactivada por la tripsina y pepsina, en cambio resiste la acción de las carboxipeptidasas¹¹³ (figura 24).

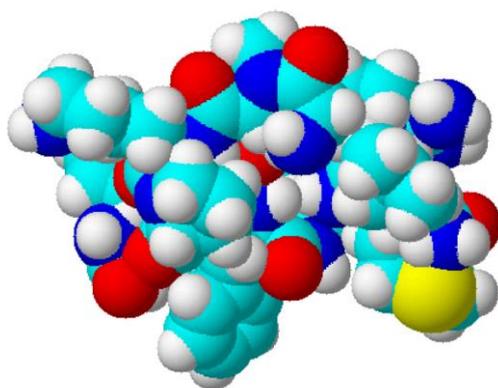


Figura 24. Estructura tridimensional de la SP

Como ya se ha comentado, la SP ejerce sus funciones mediante su unión con el **NK1R**, del que es su principal ligando, ya que es el receptor taquicinérgico por el que más afinidad presenta de los tres descritos hasta ahora. Su extremo carboxi-terminal es el que

interacciona y activa al receptor taquicinérgico, mientras que el amino-terminal define la especificidad frente al subtipo de receptor.

La SP realiza acciones como neurotransmisor, neuromodulador (regulando la actividad de otros neurotransmisores) y hormona (ejerciendo su actividad a distancia de los lugares donde es liberada).

Su actividad neurotransmisora fue propuesta ya en la década de los 50¹¹⁴. Tras ser liberada del terminal presináptico, la SP se inactiva fundamentalmente a través de la degradación por peptidasas, no por recaptación. Benuck y colaboradores¹¹⁵ aislaron en 1975 una enzima parcialmente purificada a partir de cerebro de rata que presentaba actividad proteolítica sobre la SP, denominada *endopeptidasa neutra* (EPN), y que reducía marcadamente la unión de la SP a NK1R, debido a su degradación acelerada¹¹⁶. La EPN, también llamada *encefalinasa*, es una metalopeptidasa de membrana que cataliza la ruptura de aminoácidos hidrofóbicos no terminales por su vertiente amino. Actúa sobre diferentes péptidos además de la SP, como son la insulina (cadena B), péptidos opioides, encefalinas, péptido natriurético auricular, péptido natriurético cerebral, neurotensina y neuropéptido Y. Esta enzima es inhibida primariamente por el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), fosforamidón y racecadotriilo, y es reactivada por el zinc. La EPN es idéntica al antígeno común de la leucemia aguda linfoblástica común, un marcador proteico de la leucemia aguda linfocítica^{117,118,119}.

La expresión de la SP, en la mayoría de las localizaciones estudiadas, se ha establecido a partir de técnicas de inmunohistoquímica, empleando anticuerpos selectivos frente a SP¹²⁰. Es importante señalar que algunos estudios han puesto en evidencia una reactividad cruzada de los anticuerpos anti-SP con otras endokininas similares a la SP, como la HK-1, EKA y EKB^{87,121}.

Numerosos autores han descrito la existencia de SP en la mayoría de las partes del SNC y periférico de todos los mamíferos estudiados, incluyendo al hombre, si bien su distribución es muy variable entre diferentes áreas anatómicas.

En el SNC la SP se localiza en la corteza cerebral, en las áreas somatomotora, somatosensorial, visual y olfatoria. Sin embargo, es a nivel subcortical donde se hallan las mayores concentraciones de este péptido: los núcleos caudado y putamen presentan una densidad muy elevada de somas celulares que expresan SP, presentando proyecciones de fibras axonales a la sustancia negra. De esta forma el área nigro-estriada supone una de las áreas de mayor concentración del péptido. También hallamos SP en los núcleos amigdalares del hipocampo, cápsula interna y séptum. Recientes estudios indican la

existencia de receptores de taquicinas en líneas celulares de la glía⁹⁹, astrocitos y líneas celulares de astrocitos^{122,123}. En el tronco encefálico se localiza entre los principales núcleos neuronales (destacando el trigémino), y en la médula espinal sobre todo a nivel de las astas posteriores. A nivel del sistema nervioso periférico, la SP se localiza principalmente en las neuronas sensoriales primarias de los ganglios espinales, cadena cervical simpática y en los ganglios yugular, nodoso y trigeminal¹²⁴.

En el resto del organismo, la SP está ampliamente distribuida, localizándose alrededor de los vasos sanguíneos o terminaciones nerviosas en la mayoría de órganos y tejidos: piel, folículos pilosos, glándulas sudoríparas, aparato respiratorio, genitourinario y cardiovascular, en los plexos mientérico y submucoso del sistema digestivo e incluso en la pulpa dentaria^{113,120,125}. Por último, se ha descrito la presencia de SP en la placenta, órgano carente de inervación^{83,126}.

5.4 Receptor NK1 (NK1R)

La acción biológica de la SP es fundamentalmente mediada por el NK1R, pues la SP es el ligando natural con mayor afinidad a dicho receptor¹²⁷.

La estructura del NK1R consiste en siete hélices transmembrana conectadas entre sí a través de tres bucles intracelulares y otros tres extracelulares, con un extremo N-terminal extracelular y otro C-terminal intracelular (véase figura 19).

Cuando el ligando se une al receptor se producen cambios conformacionales en las asas intracelulares del receptor y se activa la proteína G para que complete el mecanismo de traducción de la señal. Esta conformación adoptada por el receptor estaría condicionada tanto por el ligando¹²⁸ como por el microambiente, es decir, el medio extracelular y la composición fosfolipídica de la membrana en la proximidad del receptor¹²⁹. Se ha demostrado la existencia de diferentes conformaciones activas tanto en el NK1R como en el NK2R, que activarán diferentes mecanismos efectores además de una afinidad distinta por los agonistas y por los antagonistas^{128,130,131,132}.

En los últimos años se ha intentado identificar el sitio de unión de la SP con el NK1R. Como resultado de numerosos trabajos se cree que esta unión, dado el carácter hidrofílico de la SP, se produce a nivel de múltiples dominios de la cara extracelular del receptor. Los antagonistas no peptídicos, por su naturaleza hidrófoba, tienen su lugar de unión al NK1R localizado más profundamente, entre los segmentos transmembrana, a diferencia de la SP (figura 25).

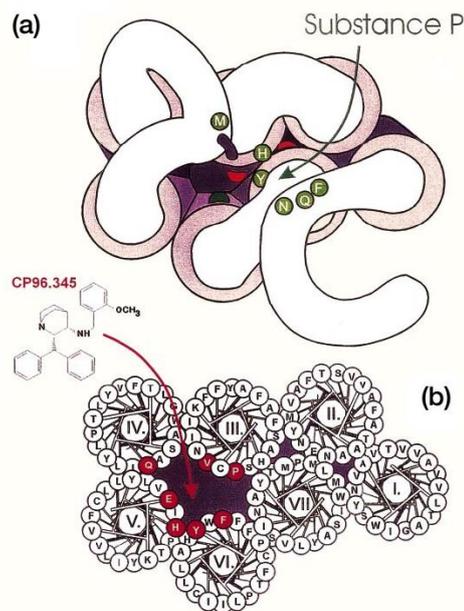


Figura 25. Representación esquemática que muestra los sitios de unión de la SP (a) y del antagonista no peptídico CP-96,345 en el NK1R (b). La primera imagen muestra la visión extracelular en la que se representan los bucles y la región N-terminal. Los círculos verdes representan los residuos que interactúan con la SP. En la segunda imagen las siete regiones transmembrana se muestran como hélices, y los círculos rojos representan los sitios de unión del antagonista CP-96,345. Hay muy poco solapamiento en los sitios de unión de la SP y de CP-96,345, aunque sean antagonistas competitivos, debido a que estos receptores funcionan como moléculas alostéricas, donde agonistas y antagonistas estabilizan diferentes conformaciones (imagen tomada de Hökfelt et al., 2001⁸⁵).

El NK1R tiene una estructura altamente conservada. A él se unen ligandos con alta afinidad, incluyendo SP y péptidos *SP-like* como hemokinina y endokinina. La unión de la SP al NK1R activa diferentes vías intracelulares entre las que figura tanto la fosfolipasa C (PLC) como la adenilato ciclasa y, como consecuencia de las mismas se produce una movilización del Ca^{++} intracelular, hidrólisis del fosfoinositol, aumento del AMPc y activación de las proteín-quinasa activadas por mitógenos (MAPKs) (figura 26).

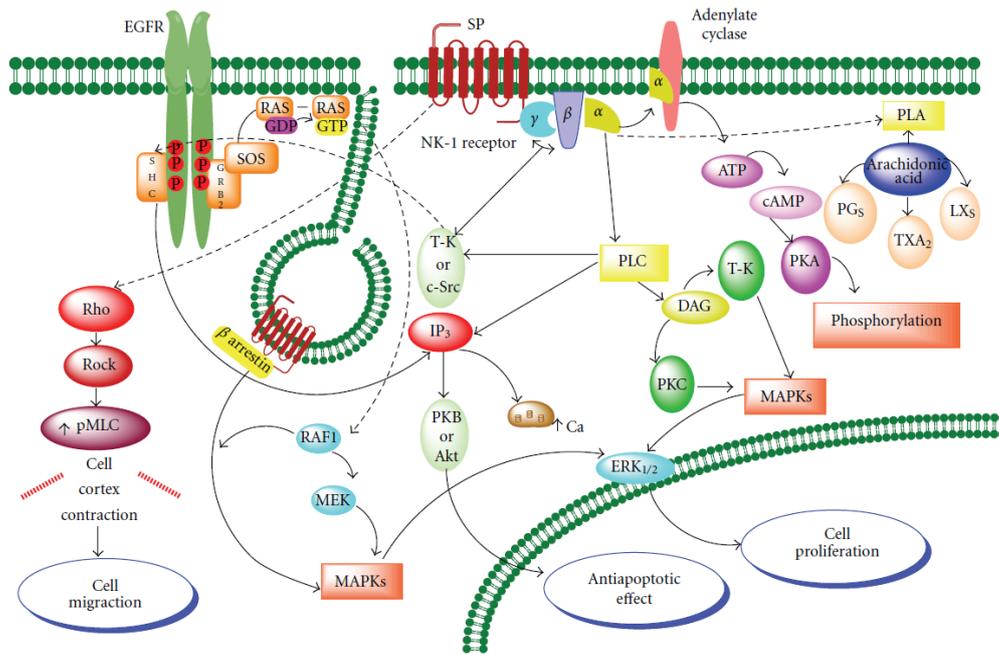


Figura 26. Representación esquemática de las vías de señalización intracelular tras la activación del NK1R por la SP, dando lugar a la proliferación celular, efecto antiapoptótico y migración celular (imagen tomada de Rosso et al., 2012¹³³).

Gracias a los estudios de Grady et al.¹³⁴, mediante estudios con microscopía confocal usando SP marcada y anticuerpos anti-NK1R, determinaron que la SP y su receptor se internalizan rápidamente por la acción de la clatrina, formando lo que se denomina **endosomas tempranos**. En estado basal, en ausencia de SP, el NK1R se encuentra en la membrana plasmática. Tras la exposición de las células a la SP, el complejo ligando-receptor se internaliza por endocitosis conformando los endosomas tempranos que se dirigen a la región perinuclear donde se acidifican provocando la disociación de la SP y el NK1R. Finalmente, tras la liberación de la SP, los receptores aparecen de nuevo en la membrana plasmática. Es posible que éste no sea el único método de entrada, como sugieren estos autores. Existen diferentes teorías para explicar este fenómeno, como son la síntesis de nuevos receptores, la inserción de receptores preformados o el reciclaje de los ya internalizados. En cambio, el ligando se degrada enzimáticamente en el interior de los endosomas, pues no aparece de nuevo en la membrana plasmática. Estos mecanismos de endocitosis y reciclaje de los receptores serían responsables de los fenómenos de **desensibilización** y **resensibilización** del NK1R en presencia de SP. Por medio de esta regulación celular frente a la SP, la célula conseguiría hacerse insensible en situaciones en las que haya cantidades excesivas de este NP.

La diferente expresión de los subtipos de NK1R en cada localización ha ofrecido nuevas perspectivas en el campo de la regulación de estos receptores, al establecer una relación entre cada TK con su subtipo de receptor y su mecanismo efector. Esto amplía las implicaciones fisiológicas derivadas de la interacción entre la SP, endokininas *SP-like*, NKA y NKB con el NK1R, pues el hecho de que cada TK pueda activar al NK1R en diferentes sitios permitiría emplear antagonistas selectivos de este receptor capaces de bloquear diferentes acciones con diferente potencia⁷⁸.

Respecto a la realización de técnicas de inmunohistoquímica para localizar el NK1R, se debe tener precaución al emplear anticuerpos dirigidos frente al extremo C-terminal de dicho receptor, ya que otras moléculas como proteínas accesorias podrían enmascarar determinantes antigénicos de dicho extremo y ocasionar resultados discordantes.

Existen dos **isoformas del NK1R**, que ya detectó Kage et al.^{135,136} en las glándulas submaxilares de la rata, y se diferencian en la longitud del extremo carboxi-terminal (figura 27).

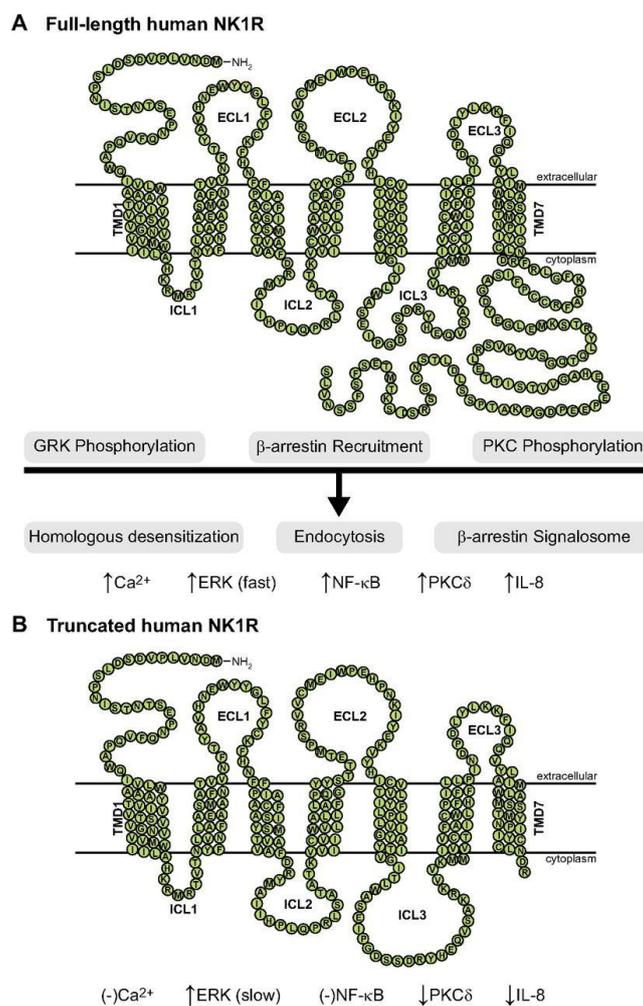


Figura 27. Comparación de la regulación y señalización de las formas larga y truncada del NK1R

en humanos. **A:** la forma larga del NK1R es fosforilada por GRKs (quinasas de los RAPG) y PKC en el extremo carboxi-terminal e interactúa con β -arrestinas, que median la desensibilización, endocitosis y señalización endosomal. **B:** el NK1R truncado carece de la mayor parte del C-terminal, no es fosforilado y no interactúa con β -arrestinas. Como resultado, presenta defectos en la desensibilización, endocitosis y señalización endosomal (imagen tomada de Steinhoff et al., 2014⁷⁶).

La **forma larga** posee 407 aminoácidos, mientras que la **forma corta (NK1R truncado)** tan solo 311. El menor número de residuos se debe al dominio intracelular ya que en esta región parece situarse el mecanismo implicado en la fosforilación dependiente de quinasas de los RAPG. Por consiguiente, la forma corta parece tener una menor capacidad para la internalización del receptor. La forma larga se expresa predominantemente en determinados sitios del cerebro humano, en cambio la forma corta se expresa a lo largo del SNC y los tejidos periféricos. Las características de la unión ligando-receptor de la forma larga del receptor coinciden con la caracterizada en los tejidos de las especies mamíferas estudiadas por el momento, de tal forma que la SP es el mayor agonista. Por el contrario, la forma corta del receptor parece tener una afinidad al menos diez veces menor que la forma larga.

Los estudios de Fong et al.¹³⁷ en 1992, indican que existen múltiples formas del NK1R humano y que la diferente activación de la respuesta intracelular podría estar en relación con la complejidad de los efectos biológicos de la SP. Estos datos sugieren que la forma corta podría representar un sistema efector diferente. Diversos estudios de secuenciación de proteínas apuntan que las dos isoformas provienen de un corte y empalme alternativo del pre-ARN mensajero.

5.5 Fisiopatología de la SP y el NK1R

Hay muchos estudios acerca de la distribución de la SP en el SNC y SNP en mamíferos^{138,139,140} y todos han mostrado que es extensa en ambos sistemas. Igualmente, muchos estudios han revelado también una amplia expresión del NK1R en el SNC de mamíferos y en tejidos periféricos, células endoteliales vasculares, células musculares, del tracto gastrointestinal y genitourinario, pulmón, glándula tiroidea y células inmunes^{141,142,143,144,145,146,147}. La SP se encuentra en todos los fluidos corporales, tales como sangre, líquido cefalorraquídeo, leche materna, etc., es decir, es ubicua en el cuerpo humano (figura 28).

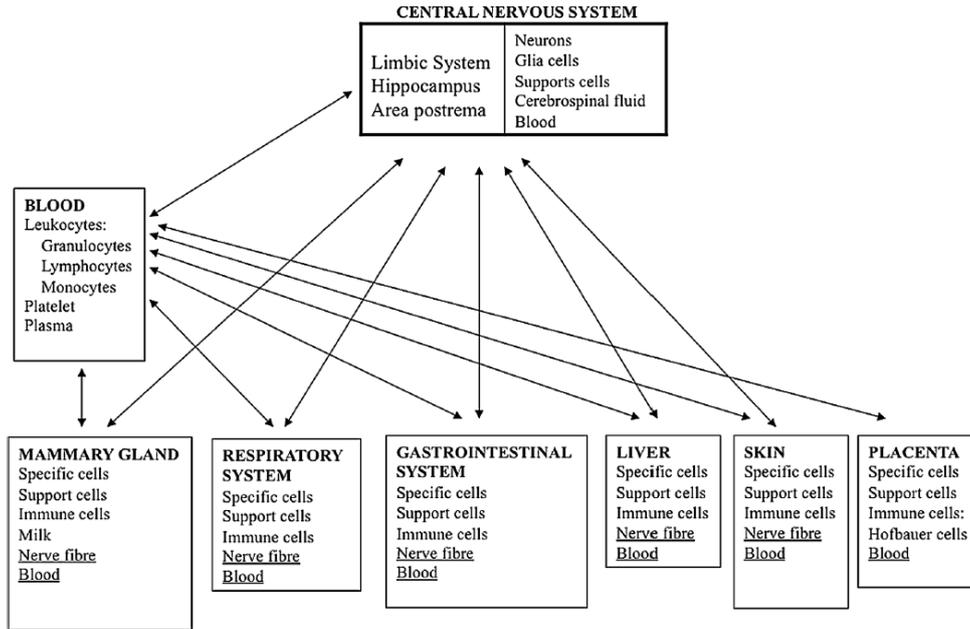


Figura 28. Interrelación entre el SNC y otros sistemas en los que la SP/NK1R está regulada positivamente en condiciones patológicas. La SP se une al NK1R por mecanismo autocrino (SP se secreta a partir de células), paracrino (la SP ejerce una acción biológica en células endoteliales y en otras células) y/o endocrino (la SP se secreta por los diferentes órganos a los vasos sanguíneos). La SP también es liberada desde las terminaciones nerviosas y/o llega a todo el cuerpo a través del torrente sanguíneo (esto es regulado por el sistema límbico) (imagen tomada de Muñoz et al., 2014¹⁴⁸).

Después de su unión con el NK1R, la SP regula muchas funciones biológicas (fisiológicas y fisiopatológicas). De entre ellas destacaremos su papel en el tracto gastrointestinal, respiratorio, urogenital, piel, sistema nervioso y sistema inmune, así como en importantes procesos patológicos, como son el cáncer, el dolor o la inflamación.

5.5.1 Tracto gastrointestinal

En el tracto gastrointestinal, las TK son neurotransmisores que regulan la motilidad intestinal, secreción y funciones vasculares. También contribuyen en la respuesta del intestino a la inflamación y el dolor¹⁴⁹. Las taquicininas coexisten con la acetilcolina, el transmisor primario de neuronas excitatorias que inervan el músculo, y actúan como un co-neurotransmisor de estas neuronas. La transmisión excitatoria está mediada por los receptores NK1 (principalmente en las células intersticiales de Cajal) y los receptores NK2 en el músculo. Además, las TK participan en la transmisión excitatoria lenta en las sinapsis neuro-neuronales, a través de los receptores NK1 y NK3, tanto en vías

ascendentes como descendentes que afectan a la motilidad. Por otro lado, la activación de los NK1R y NK2R en el epitelio, estimula la secreción de fluidos. Durante la inflamación se activan los RTK en las células inmunes. Por último, las taquicininas se liberan de los terminales centrales de las neuronas aferentes gastrointestinales en la médula espinal, particularmente en las vías nociceptivas.

5.5.2 Tracto respiratorio

Las TK tienen una gran potencia broncoconstrictora y se piensa que pueden tener un papel relevante en algunas enfermedades crónicas de la vía aérea como el asma o la EPOC. Los primeros en determinar la inmunorreactividad de la SP en el aparato respiratorio fueron Nilsson y colaboradores¹⁵⁰, quienes identificaron SP en fibras nerviosas del músculo, tejido conectivo y epitelio traqueobronquial. Hoy sabemos que la SP es un broncoconstrictor muy potente que además tiene gran efecto vasodilatador sobre los vasos de la vía aérea, induce la secreción de moco y regula el mecanismo de aclaramiento mucociliar¹⁵¹, además tiene un importante papel en la hiperreactividad alérgica de las vías respiratorias.

5.5.3 Tracto urogenital

En el sistema urinario las TK estimulan el tono muscular liso, el peristaltismo ureteral y las contracciones de la vejiga, inician *inflamación neurogénica* y provocan reflejos locales y espinales destinados a mantener las funciones de los órganos en situaciones de emergencia. A nivel genital, están involucradas en la contracción del músculo liso, en la inflamación y en la modulación de la secreción de esteroides por parte de los testículos y los ovarios¹⁵². La SP y el NK1R están distribuidos ampliamente por el cordón umbilical y la placenta en humanos¹⁵³. La SP tiene un efecto vasodilatador de los lechos vasculares placentarios maternos y fetales y parece estar involucrada en la función reproductiva, el aborto inducido por el estrés¹⁵⁴ y la preeclampsia^{155,156}.

5.5.4 Piel

La SP se encuentra en los terminales nerviosos de las fibras existentes en la dermis papilar y epidermis. También se objetiva en los corpúsculos de Meissner, así como en las inmediaciones de las glándulas sudoríparas y los vasos sanguíneos^{157,158}. Sus funciones en la piel están relacionadas con la inflamación, el dolor y el prurito. También está implicada en la cicatrización de las heridas¹⁵⁹ y en la alopecia inducida por el estrés¹⁶⁰.

5.5.5 Sistema nervioso central

A nivel cortical, la SP actúa modulando la actividad neuronal, aumentando esta actividad de manera intensa y duradera¹⁶¹. A nivel del tracto hipotálamo-hipofisario induce un aumento en la liberación de hormonas hipofisarias¹⁶². La sustancia negra es de las zonas que mayor concentración de SP posee de todas las regiones cerebrales. Parece ser que la SP actúa como un neurotransmisor estimulador de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal, mientras que el GABA y la dinorfina A actúan como inhibidores. Se ha comprobado cómo en la enfermedad de Párkinson¹⁶³, que se caracteriza por tener una menor concentración de dopamina en la sustancia negra, existe una disminución de la concentración de SP. La presencia de SP y NK1R en áreas como la amígdala sugiere su participación en el comportamiento emocional y la respuesta neuroquímica al estrés^{164,165,166}. En la médula espinal la SP está presente fundamentalmente en las neuronas de las astas posteriores, aunque también lo está en las laterales y, en menor medida, en las anteriores.

5.5.6 Sistema inmune

La SP y el NK1R son expresados por múltiples células inmunitarias:

- **Neutrófilos:** la SP regula la actividad y función de estas células, y puede controlar su producción e infiltración en tejidos inflamados.
- **Monocitos y macrófagos:** es conocido el papel de la SP en la regulación de la función de los macrófagos durante la cicatrización de las heridas, la inflamación, autoinmunidad y la infección^{159,167}.
- **Células dendríticas:** estas células coordinan la activación de los linfocitos antígeno-específicos efectores y de memoria, jugando un mayor rol en la inmunidad adquirida. Las células de Langerhans expresan SP¹⁶⁸, que puede controlar la proliferación de células T¹⁶⁹ y regular otras células de la piel, como los queratinocitos.
- **Mastocitos:** existe una comunicación bidireccional entre los mastocitos y las neuronas sensoriales primarias, por lo que los NP estimulan los mastocitos y éstos controlan la liberación de NP. La SP induce la liberación de TNF α (factor de necrosis tumoral α) y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) de los mastocitos, contribuyendo así a la inflamación, inmunidad y angiogénesis. Además, la SP estimula la liberación de histamina.

- **Eosinófilos:** no es bien conocida la activación de los eosinófilos por las TK ni la producción de TK por parte de los eosinófilos. Se piensa que están implicadas las células epiteliales.
- **Linfocitos:** las células T sintetizan SP y expresan NK1R durante la inflamación y la infección. La SP regula la proliferación de células T, la liberación de citoquinas y quimioquinas, y estimula la actividad de los linfocitos *Natural Killer*.

En la tabla 11 se resumen los efectos proinflamatorios de la SP en diversas células inmunitarias.

Tabla 11. Efectos proinflamatorios de la SP en células inmunes (imagen tomada de O'Connor et al., 2004¹⁷⁰).

Cell type	Effects
Lymphocytes	Potent chemoattractant B lymphocyte differentiation cofactor Increases immunoglobulin secretion Stimulates T lymphocyte proinflammatory cytokine release Stimulates T lymphocyte natural killer activity Stimulates T lymphocyte proliferation Lymphocytes can produce SP
Monocytes/macrophages	Potent chemoattractant Stimulates proinflammatory cytokine release Induces oxidative burst Stimulates synthesis and release of arachidonic acid metabolites Macrophages express NK-1R and secrete SP
Neutrophils	Chemoattractant Stimulates degranulation and respiratory burst Increases adherence to epithelial cells (upregulates adhesion molecule expression) Stimulates proinflammatory cytokine release
Mast cells	Close contact between mast cells and nerves Induces degranulation Induces histamine and serotonin release Stimulates proinflammatory cytokine release
Eosinophils	Chemoattractant Stimulate activation, degranulation, release of O ₂ ⁻ , and thromboxane Eosinophils can secrete SP

5.5.7 Nocicepción

La mayoría de las fibras C aferentes que expresan SP pertenecen a distintos tipos de nociceptores que se activan mediante estímulos térmicos, químicos y mecánicos, ya sea en la piel o bien por distensión visceral¹⁷¹. A partir de sus terminales, tanto centrales como periféricos, estas neuronas al ser estimuladas, liberan SP, NKA y CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina).

A nivel central, la liberación de SP ejerce su actividad a través de un efecto denominado *potencial postsináptico excitador de baja velocidad* que actúa sobre las neuronas de segundo orden en la médula espinal y tronco cerebral. Esta activación produce

modulación del reflejo protector de flexión, percepción del dolor, así como varios reflejos autónomos y respuestas endocrinas.

A nivel periférico, los axones de estas fibras C aferentes presentan una gran distribución colateral en una gran variedad de tejidos como piel, vísceras y ganglios autónomos. Cuando las terminaciones de estas fibras son estimuladas se envían impulsos, por un lado, hacia las ramas de los axones periféricos para inducir el reflejo axonal, por otro lado, hacia los ganglios autónomos y, por último, hacia el SNC para transmitir la señal de dolor.

Hoy sabemos que la SP no solo regula la excitabilidad de las neuronas nociceptivas del asta dorsal y la integración del dolor a nivel central, sino que también está involucrada en la generación del estrés y ansiedad que éste desencadena¹⁷².

5.5.8 Inflamación

Las fibras C de las terminaciones de neuronas primarias aferentes sensibles a la capsaicina son las responsables de la **inflamación neurogénica** en órganos periféricos¹⁷³ y la SP es un mediador en este proceso¹⁷⁴. Estas neuronas median respuestas nociceptivas a estímulos físicos (térmicos, mecánicos) y químicos. La inflamación neurogénica consiste en un incremento de la permeabilidad vascular, dilatación arteriolar, extravasación del plasma, formación de edema y la infiltración de leucocitos desde vénulas poscapilares (figura 29).

La SP ha sido implicada también en la resolución de la inflamación, mediante un efecto proliferativo en determinadas células. Este péptido actúa como un mitógeno para las células del músculo liso, los fibroblastos, las células endoteliales y los sinoviocitos^{122,175,176,177}. Por tanto, tiene un papel importante en la **angiogénesis**¹⁷⁸.

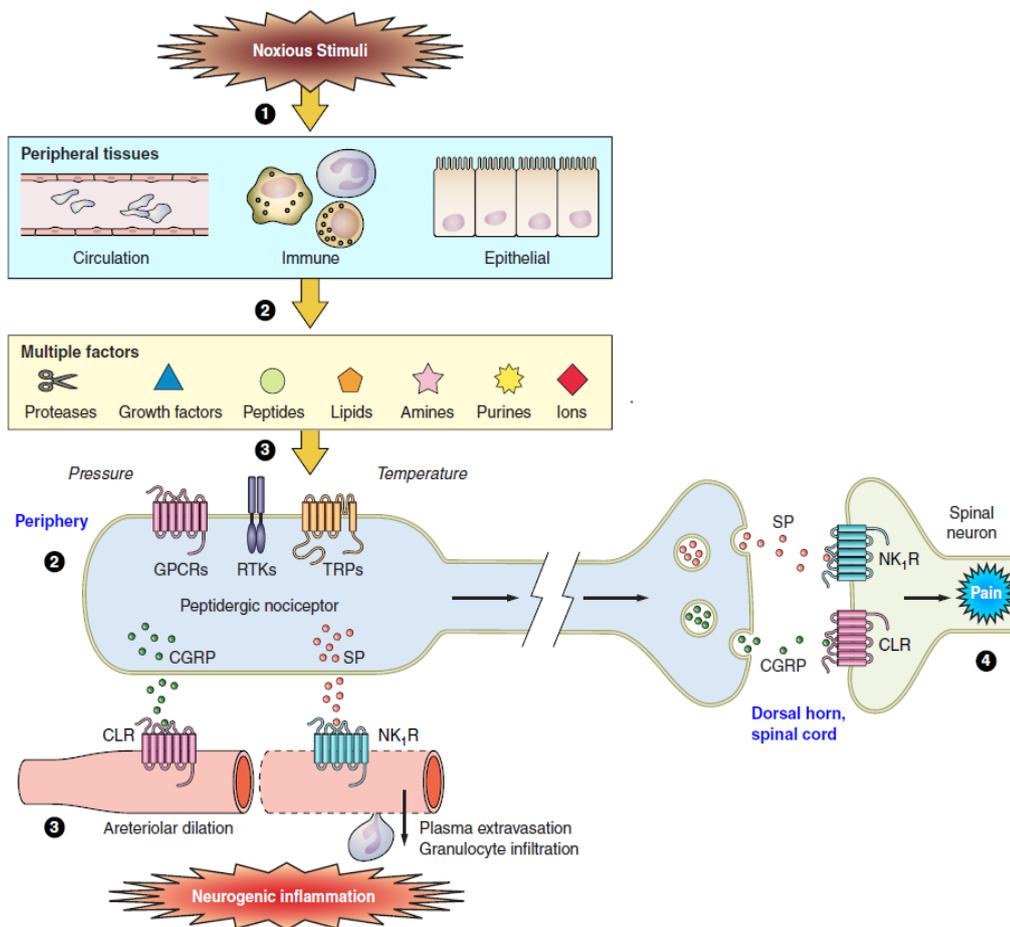


Figura 29. Contribución de las TK y sus receptores en la inflamación neurogénica y el dolor. **1:** El estímulo nocivo en los tejidos periféricos conduce a la liberación o formación de múltiples factores que derivan de la circulación, de células inmunes y de tejido epitelial, como son proteasas, factores de crecimiento, péptidos (bradicininas), lípidos (prostaglandinas), aminas, purinas, iones, la presión o el aumento de temperatura. **2:** Estos factores pueden activar varios tipos de receptores y canales, incluyendo RAPG, canales TRP (receptor de potencial transitorio) y RTKs (receptores tirosín quinasa). **3:** Los nociceptores activados liberan NP en los tejidos periféricos, como la SP y la NKA, que estimulan los NK1Rs en las células endoteliales de las vénulas poscapilares y provocan la extravasación del plasma y la infiltración de granulocitos, y el CGRP, que estimula el CLR (*calcitonin like-receptor*) en arteriolas para causar hiperemia. Estos cambios constituyen la inflamación neurogénica. **4:** Si estos factores excitan a los nociceptores y generan potenciales de acción, la SP y el CGRP también son liberados de las proyecciones centrales de los nociceptores en el asta dorsal de la médula espinal, donde los NP activan a los receptores de las neuronas espinales para transmitir el estímulo doloroso a nivel central (imagen tomada de Steinhoff et al., 2014⁷⁶).

5.5.9 Cáncer

Diferentes estudios, entre los que destacan los realizados por el equipo del Dr. Muñoz, muestran la expresión de la SP en tumores odontogénicos queratoquísticos, carcinomas orales de células escamosas, cáncer de laringe, melanoma, glioma, retinoblastoma, neuroblastoma y cáncer de pulmón^{179,180,181,182,183}. La SP ha sido localizada tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células tumorales^{179,180,181,184}.

Los NK1R también se han descrito en tumores primarios como el glioma, astrocitoma, retinoblastoma, ganglioneuroblastoma, leucemia, neuroblastoma, carcinomas (pancreático, laríngeo, gástrico, de colon, medular de tiroides, mama y carcinoma oral)^{179,180,181,182,185,186}. Además, los NK1R se sobreexpresan en las células tumorales, en comparación con las células no tumorales^{182,184,185,187}. La SP, de una forma concentración-dependiente, puede inducir la proliferación de las células tumorales en diferentes tipos de líneas celulares tumorales.

La **neoangiogénesis** es estimulada por la SP¹⁷⁶. En la mayoría de tumores estudiados tanto la SP como el NK1R se encuentran en los vasos sanguíneos intra y peritumorales, e incluso, durante la neoangiogénesis se incrementa la inervación del tejido y la expresión de NK1Rs. Por otro lado, la **migración** de las células tumorales es crucial para el desarrollo de metástasis. Se conoce que dicha migración es inducida por los NT clásicos (dopamina, noradrenalina), así como por la SP, cuya interacción con el NK1R induce un cambio en la morfología celular (*blebbing*) lo que facilita la movilización, extensión e infiltración celular^{188,189}.

Por todo esto, el bloqueo de los receptores NK1 se ha convertido en una diana terapéutica de creciente interés en los últimos años^{133,147,182,183,184,190,191,192}.

5.6 Antagonistas de los NK1Rs

El NK1R se expresa a lo largo del SNC y de los tejidos periféricos en mamíferos. Gracias a las herramientas farmacológicas de las que se dispone hoy en día (agonistas y antagonistas) se pueden esclarecer las funciones fisiológicas del NK1R y establecer las posibles aplicaciones terapéuticas de los antagonistas de los NK1R.

Hay dos grupos de antagonistas de los NK1R: los antagonistas peptídicos y los antagonistas no peptídicos.

5.6.1 Antagonistas peptídicos

La mayoría de los trabajos realizados en el diseño y preparación de los antagonistas peptídicos se han centrado en la introducción de D-aminoácidos. Sin embargo, estos antagonistas presentan menor afinidad por el NK1R que sus agonistas naturales, inestabilidad metabólica e imposibilidad para atravesar la barrera hematoencefálica, motivos por los cuales, su utilidad en estudios *in vivo* está limitada. Además, después de ser administrados en el SNC estas sustancias presentan baja potencia, incapacidad para discriminar entre RTK, actividad agonista residual parcial e inducen neurotoxicidad^{147,182}.

El primer antagonista de origen peptídico que se desarrolló fue el **Spantide** (DArg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-DTrp-Phe-DTrp-Leu-Leu-NH₂), no muy activo y neurotóxico¹⁹³. Para evitar estos efectos y con el fin de aumentar la potencia y la selectividad se desarrolló el **Spantide II**¹⁹⁴ (DNicLys-Pro-Pal-Pro-DCl₂Phe-Asn-DTrp-Phe-DTrp-Leu-Nle-NH₂). Estos dos antagonistas son de tipo peptídico lineal. Con posterioridad se desarrollaron otros antagonistas peptídicos de tipo cíclico¹⁹⁵ como el **FK224** que tiene la particularidad de actuar sobre el NK1R y NK2R, lo cual podría tener ciertas aplicaciones terapéuticas, o el **L-668,169** con una gran afinidad sobre el NK1R. Las investigaciones posteriores se encaminaron a desarrollar un antagonista mediante la delección progresiva de aminoácidos con el fin de conseguir la estructura con menor peso molecular que mantuviera una alta afinidad y selectividad. Estos estudios llevaron al desarrollo de los antagonistas tripeptídicos; entre ellos, el **FR 113680** fue el que mejor resultado obtuvo.

5.6.2 Antagonistas no peptídicos

Las limitaciones encontradas en los antagonistas peptídicos, impulsó la búsqueda y desarrollo de nuevos antagonistas no peptídicos de diferente naturaleza: esteroidea, derivados piperidínicos y derivados del triptófano¹⁹⁶.

El primer antagonista no peptídico descrito con actividad selectiva frente al NK1R fue **CP-96,345**¹⁹⁷ (véase figura 25), que se encuentra dentro del grupo de los derivados de la quinuclidina, junto con **L-709,210**. Entre los antagonistas tipo esteroideos destaca **WIN-51,708** y, entre las perhidroisoindolonas, **RP-67,580**, **RP-73,467** y **RPR-100,893**. Dentro de las benziléter piperidinas encontramos el **L-733,060**, **L-741,671** y el **L-742,694**. En el grupo de las benzilamino piperidinas destacan el **CP-99,994**, **GR-203,040**, **GR-205,171** y **CP-122,721**. Por último, en los derivados del triptófano se incluye el **L-732,138**¹⁴⁸.

Se han llegado a presentar más de 500 patentes de antagonistas de NKRs durante los últimos 20 años, algunos han sido evaluados en ensayos clínicos. A pesar del intenso esfuerzo, solo se ha logrado la aprobación por parte de la FDA (*Food and Drug Administration*) de un antagonista, **Aprepitant** y su profármaco **Fosaprepitant**, para tratar las náuseas y vómitos inducidos por la quimioterapia^{198,199,200}. El aprepitant está disponible para uso oral y el fosaprepitant para uso intravenoso.

La fórmula química del aprepitant es $C_{23}H_{21}F_7N_4O_3$ (figura 30).

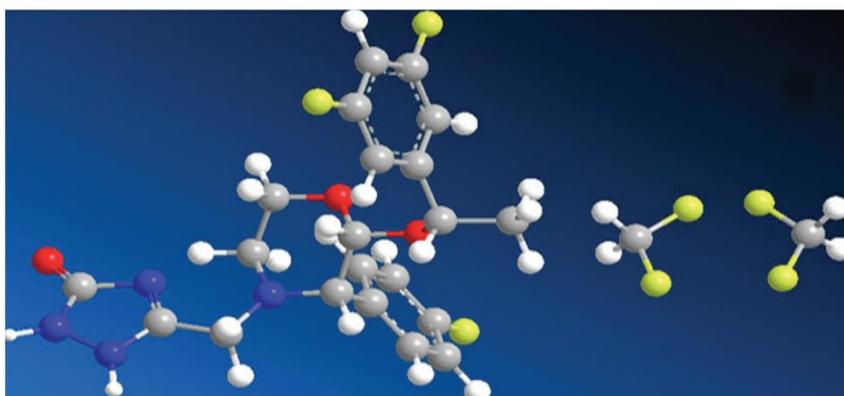


Figura 30. Estructura química del Aprepitant. Los átomos de carbono están representados en gris, hidrógeno en blanco, flúor en amarillo, nitrógeno en azul y oxígeno en rojo (imagen tomada de Rosso et al., 2012¹³³).

Estudios en animales y seres humanos con Aprepitant han demostrado que cruza la barrera hematoencefálica y ocupa los receptores encefálicos NK1R. En modelos animales inhibe la emesis inducida por agentes quimioterapéuticos citotóxicos, entre ellos, cisplatino, mediante acciones centrales. Los estudios en animales y en humanos demuestran que Aprepitant aumenta la actividad antiemética del antagonista de los receptores 5-HT₃ ondansetrón y el corticosteroide dexametasona, y que inhibe las fases agudas y tardías de emesis inducida por cisplatino^{199,201}.

5.6.3 Aplicaciones terapéuticas

Una característica de los NP es la plasticidad en su expresión. En varios sistemas, los péptidos pueden ser expresados normalmente a niveles muy bajos, pero están regulados positivamente en respuesta a, por ejemplo, una lesión nerviosa²⁰². Los antagonistas del NK1R actúan de una forma concentración-dependiente, es decir, en los sistemas alterados con altas concentraciones de SP, pudiendo así bloquear las acciones fisiopatológicas de

la SP y, por tanto, ser utilizados como una herramienta terapéutica en patologías humanas en las que el sistema SP / NK1R esté implicado¹⁴⁸ (figura 31).

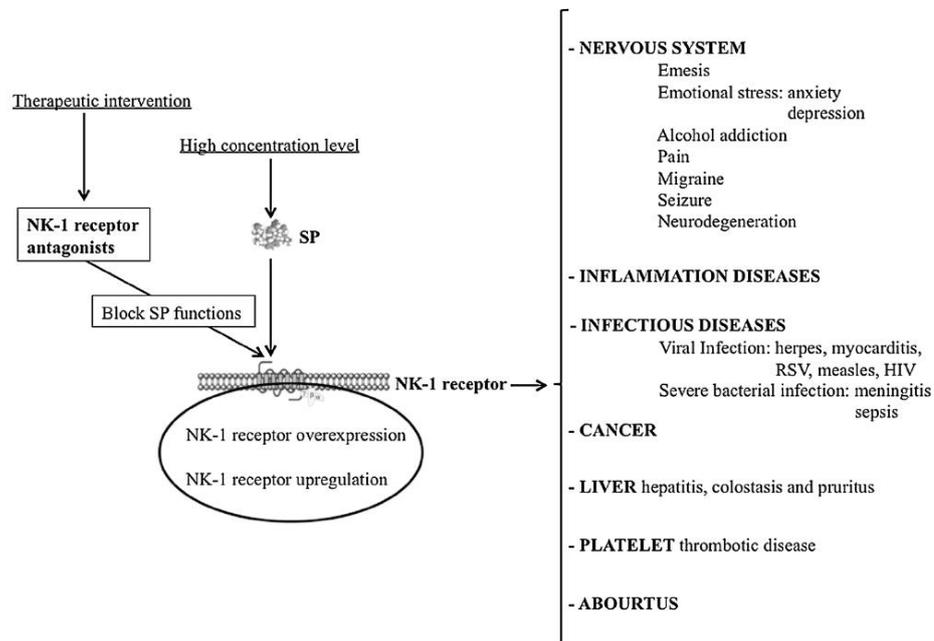


Figura 31. Implicación del complejo SP/NK1R en la patología humana. En muchas enfermedades, este complejo está alterado, por lo que los antagonistas del NK1R podrían bloquear las acciones fisiopatológicas mediadas por la SP. Por ejemplo, en las células cancerígenas existe una sobreexpresión del NK1R y, por otro lado, en pacientes con VIH se han descrito niveles altos de SP (imagen tomada de Muñoz et al., 2014¹⁴⁸).

Se han descrito muchas enfermedades en el ser humano en las que el sistema SP/NK1R está implicado como son la emesis, la migraña, la depresión y ansiedad, el dolor, la epilepsia, enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, esclerosis múltiple, ELA, corea de Huntington), enfermedades inflamatorias (asma, bronquitis crónica, EII, artritis reumatoide), infecciones virales (Herpes, sarampión, VRS, VIH) y bacterianas (sepsis, meningitis), así como el aborto, la hepatitis, el prurito, trombosis, y también, el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis.

La aplicación de los antagonistas del NK1R en el tratamiento de estas enfermedades constituye una excelente estrategia (tabla 12).

Tabla 12. Aplicaciones terapéuticas de los antagonistas del NK1R (imagen tomada de Muñoz et al., 2011¹⁴⁷).

DISEASE	THERAPY
Emesis	Antiemetic
Anxiety	Anxiolytic. Acting on the limbic system.
Depression	Antidepressive. Acting on the limbic system.
Pain	Analgesic
Inflammation. Asthma, sarcoidosis, chronic bronchitis, inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis.	Antiinflammatory.
Migraine	Antimigraine
Alcoholism	Antialcohol addiction
Neurodegenerative diseases	Neuroprotection. Antiapoptotic action.
Acute and chronic hepatitis (toxic and viral origen)	Hepatoprotector. Antiinflammatory, Antiapoptotic, Antinecrosis, antiviral.
Cholestasis and pruritus	Anticholestasis. Antipruritus.
Viral infection. Human immunodeficiency virus, respiratory syncytial virus, myocarditis, measles virus, subacute sclerosing panencephalitis.	Antiviral action.
Cancer	Antitumour action. Inhibition of tumour cell proliferation, apoptotic effect, antiangiogenesis, antimigration of tumour cells.

Muchos ensayos clínicos han informado de la ausencia de efectos secundarios graves con la administración de antagonistas de los NK1R en seres humanos²⁰³, incluso cuando el antagonista del NK1R se administró a dosis altas (300 mg/día)¹⁶⁵. Por todo esto, están surgiendo nuevas posibilidades de investigación para mejorar el tratamiento de enfermedades en las que el sistema SP/NK1R está regulado positivamente. Sin embargo, cabe señalar que, aunque muchos estudios preclínicos han informado de los efectos beneficiosos de los antagonistas del NK1R en el tratamiento de ciertas enfermedades, a menudo no se encontraron estos efectos en ensayos clínicos humanos. Esto podría explicarse en parte por las especies utilizadas en estos estudios. En este sentido, se ha informado de que varias especies muestran cambios en la secuencia de aminoácidos del NK1R y, por tanto, estas variaciones podrían regular la intensidad de acción de los antagonistas del NK1R estudiados^{145,204,205}. Otra explicación podría ser los criterios clínicos elegidos para la selección de los pacientes incluidos en los ensayos en humanos¹⁴⁵ o las diferentes dosis administradas^{165,206}.

Con respecto a las amígdalas palatinas y el sistema SP/NK1R, la bibliografía actual está muy limitada. Hemos encontrado solo 3 artículos relacionados con este punto. En el primero de ellos, Reubi et al.²⁰⁷ determina la localización de los receptores de la SP, entre otros, en los diferentes tejidos linfoides humanos, incluyendo las amígdalas. En el segundo, Goldbart et al.²⁰⁸ sugiere que la exposición temprana al VRS podría inducir cambios neuroinmunomoduladores (en los que estaría implicada la SP y el receptor NK1R), que estimularían la proliferación del tejido adenoamigdalario en niños con SAOS. Por último, el estudio de Gozal et al.²⁰⁹ apoya la idea del uso de antagonistas del NK1R en el tratamiento de niños con SAOS.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La SP es ubicua en el cuerpo humano. Se encuentra tanto en el SNC como en el SNP, en fuentes neuronales y no neuronales. A través de su acción mediada por la unión al NK1R, interviene en el procesamiento de la respuesta inflamatoria de los tejidos. Las células del sistema inmune (células dendríticas, monocitos-macrófagos, neutrófilos, linfocitos, mastocitos, eosinófilos) expresan SP y NK1R, además SP/NK1R se sobreexpresan durante la inflamación y la infección. A su vez, la SP posee efectos proinflamatorios y actúa regulando la función de las células inmunitarias de nuestro organismo, contribuyendo así a la inflamación y a la inmunidad.

Las amígdalas son órganos de tejido linfoide que combaten las infecciones a través de la activación inmunológica que inician. Se caracterizan por la presencia de criptas, cuyo epitelio especializado se compone de diversas células inmunes que se encargan de analizar el antígeno con el que toman contacto, iniciándose una cascada de respuesta inmune no solo a nivel local, sino también sistémico.

La **hipótesis** que nos planteamos en este estudio es que, al igual que las células inflamatorias y no inflamatorias expresan SP y NK1R, y a su vez, en los procesos inflamatorios e infecciosos la SP y el NK1R están sobreexpresados, probablemente la SP y el NK1R se sobreexpresen en las estructuras y células que componen la amígdala que ha sufrido infecciones recurrentes.

Los **objetivos** de este trabajo, mediante el empleo de técnicas de inmunohistoquímica, son:

1. Estudiar la expresión, localización y distribución de la SP en tejido amigdalario de niños con amigdalitis recurrentes.
2. Estudiar la expresión, localización y distribución del NK1R en tejido amigdalario de niños con amigdalitis recurrentes.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL DE ESTUDIO

1.1 MATERIAL FUNGIBLE

- Micropipetas serológicas estériles de 1 a 10 μ l y de 10 a 500 μ l (Gilson, Francia).
- Portaobjetos cargados electrostáticamente (Leica Biosystems, Alemania).
- Cubreobjetos (Leica, Alemania).
- Puntas de pipeta estériles de 1 a 10 μ l y de 10 a 500 μ l (Nunc Brad Products, Dinamarca).
- Papel de filtro (Auxilab, España).
- DPX (medio sintético de montaje) (BDH Laboratories, Reino Unido).
- Alcohol (Instrumentación técnico analítica, España).
- Xilol (Instrumentación técnico analítica, España).
- Kit de inmunohistoquímica “Bond™ Polymer Refine Detection” (Leica Biosystems, Alemania) que contiene:
 1. Bloqueante de peroxidasa: tampón fosfato con peróxido de hidrógeno.
 2. Polímero Poly-HRP-IgG anti-conejo.
 3. Cromógeno DAB: 3,3-diaminobencidina tetraclorhidrato en solución estabilizante.
 4. Peróxido de hidrógeno en solución estabilizante.
 5. Hematoxilina.
- Bond™ Wash Solution 1X (Leica, Alemania).
- Bond™ Dewax Solution (Leica, Alemania).
- Bond™ Epitope Retrieval Solution 1 (Leica, Alemania).
- Formol (Instrumentación técnico analítica, España).
- Parafina (Merck, España).

1.2 MATERIAL INVENTARIABLE

- Inmunoteñidor Bond RX™ (Leica Biosystems, Alemania).
- Microtomo (Leica Geosystems, España).
- Frigorífico Superser Ecologic.
- Estufa para temperatura de 37°C (Labline, España).
- Microscopio óptico Leica DM 2000.

- Objetivos Leica NPLAN 5x, 10x, 20x, 40x y 60x.
- Escáner iScan HT 360 Roche-Ventana.
- Programa para fotografía digital Ventana Image Viewer, versión 3.1.4, año 2012.

1.3 MATERIAL BIOLÓGICO: ANTICUERPOS Y TEJIDO AMIGDALAR

Se emplearon los siguientes anticuerpos:

- Anticuerpo policlonal de conejo anti-NK1R (Sigma-Aldrich, España).
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-SP (Sigma-Aldrich, España).

Las muestras de tejido amigdalor se obtuvieron a partir de las amigdalectomías realizadas por el servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Virgen de Valme, contando para ello con la colaboración del departamento de Anatomía Patológica de dicho centro.

La selección de casos se llevó a cabo entre los meses de septiembre y noviembre de 2017 y los **CRITERIOS DE INCLUSIÓN** fueron:

- Amigdalectomías desarrolladas en régimen de cirugía mayor ambulatoria, que cumplen los siguientes criterios^{55,210}:
 - Mayores de 3 años
 - No presentan enfermedades sistémicas graves
 - No presentan malformaciones corporales, especialmente craneofaciales que afecten a la vía aérea.
 - No tienen obesidad mórbida.
 - Presentan un riesgo quirúrgico ASA I (paciente sano) ó ASA II (paciente con enfermedad leve sin limitación funcional) de la clasificación de la American Society of Anesthesiologists (ASA).
- Amigdalectomías como indicación quirúrgica de amigdalitis de repetición.
- Edades comprendidas entre los 3 y 14 años.

Se consideraron como **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**:

- Material histológico con mal estado de conservación, daños o artefactos en su procesamiento.

- Dentro del protocolo de la intervención quirúrgica se excluyen pacientes que presenten alguna incidencia clínica (resfriados, fiebre, agudización de su proceso) en los días previos a la intervención.
- Según acuerdo con el servicio de Anestesiología del Hospital de Valme se excluyen de la cirugía mayor ambulatoria las siguientes patologías:
 - Patología cardíaca concomitante.
 - Patología respiratoria concomitante (incluido asmáticos que requieran broncodilatadores de uso frecuente).
 - Obesidad mórbida (IMC>40).
 - SAOS (incluido por hipertrofia amigdalal).
 - Síndrome de Down y síndromes congénitos craneofaciales.
 - Epilepsia, parálisis cerebral y otros síndromes neurológicos.
 - Complicaciones anestésicas previas.
 - Alergia a anestesia (atropina, relajantes musculares y antecedentes familiares o personales de hipertermia maligna).
 - Alergia al huevo, derivados lácteos y frutos secos.

De las dos amígdalas resecaadas en cada caso se seleccionó para el estudio una de ellas, de manera aleatoria.

2. MÉTODO DE TRABAJO

2.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio observacional descriptivo anatómico-morfológico semicuantitativo de la expresión y distribución inmunohistoquímica de la SP y NK1R.

2.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Los pacientes que conforman el material del estudio fueron tratados quirúrgicamente en el Hospital El Tomillar, centro adscrito al Área Hospitalaria de Valme. El número total de pacientes (casos) seleccionados fue de 27, de los cuales, 10 fueron niñas y 17 niños.

2.3 NÚMERO DE MUESTRAS

Para cada caso del estudio disponemos de tres muestras de tejido amigdalario, correspondientes a la tinción con SP, NK1R y tinción con hematoxilina-eosina. Además, se añaden dos muestras más como control negativo para SP y NK1R. También se eligió una muestra de placenta como control positivo tanto de SP como NK1R, previamente analizado, valorado, validado y publicado por Muñoz et al.^{153,183}. De esta manera, el número total de muestras estudiadas ha sido 85.

2.4 ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN

Estudio sujeto a los principios adoptados por la 18ª Asamblea Médica Mundial (Helsinki, 1964) y posteriores revisiones. Se han seguido las normas de Buena Práctica Clínica dictadas por la Conferencia Internacional de Armonización de Directrices sobre Buena Práctica Clínica y los requisitos de las Autoridades Sanitarias Españolas establecidos en el Real Decreto 711/2002 de 19 de Julio. Los sujetos de estudio se identificaron mediante código único de manera confidencial. Se ha cumplido lo estipulado por la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal.

Se presentó el proyecto del estudio, previo a su realización, al Comité de Ética de la Investigación, tanto del Hospital Virgen del Rocío, como del Hospital Virgen de Valme, siendo considerado apto para su realización.

2.5 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS E INMUNOHISTOQUÍMICA INDIRECTA

2.5.1 Realización de cortes y preparación de muestras.

Las muestras fueron incluidas en bloques de parafina según el protocolo habitual del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen de Valme. La técnica de inmunohistoquímica se llevó a cabo en el Nodo Biobanco del Hospital Virgen del Rocío-Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS). Se realizaron cortes de los tejidos de 5 µm con un microtomo y se montaron en portaobjetos destinados para inmunohistoquímica, identificándolos mediante serie numerada. Estas muestras de tejido parafinado se incubaron durante 12 horas en una estufa a 37°C y 30 minutos antes de la realización de la inmunohistoquímica a 60°C.

Los portaobjetos se colocaron en los soportes y se introdujeron en el inmunoteñidor Bond RX^m para realizar la desparafinación, recuperación antigénica y tinción inmunohistoquímica de forma automatizada.

2.5.2 Desparafinación y recuperación antigénica.

La desparafinación se realizó con el reactivo Bond Dewax Solution (Leica) y la recuperación antigénica con calor (98°C) y buffer citrato (BondTM Epitope Retrieval 1, Leica) durante 20 minutos.

2.5.3 Inhibición de la peroxidasa endógena.

Posteriormente, los portaobjetos se incubaron con una solución acuosa de peróxido de hidrógeno durante 15 minutos para inhibir la actividad peroxidasa endógena; a continuación, se lavaron con tampón de lavado (BondTM Wash Solution 1X, Leica) y se incubaron durante 10 minutos con tampón bloqueante para impedir la posible unión inespecífica del anticuerpo primario a componentes celulares.

2.5.4 Preparación de la dilución de los anticuerpos primarios e incubación.

Se prepara una solución para cada anticuerpo policlonal de conejo, usando un diluyente comercial (Leica) a una proporción 1:3000 para el anticuerpo anti-SP y 1:500 para el anti-NK1R. El tiempo de incubación en el inmunoteñidor es de 60 minutos a temperatura ambiente para los dos anticuerpos.

2.5.5 Incubación con los anticuerpos secundarios.

Después de lavar las muestras tres veces con tampón de lavado 1X, 5 minutos cada vez, se añade el anticuerpo secundario (unido a un polímero marcado con peroxidasa, Leica). Se deja incubar 40 minutos para el anticuerpo anti-SP y 60 minutos para el anticuerpo anti-NK1R. A los controles negativos (sin anticuerpo primario) se les añade el polímero de igual forma. Finalmente se vuelven a lavar todas las muestras tres veces con tampón de lavado 1X, 5 minutos cada vez.

2.5.6 Revelado

Se añade peróxido de hidrógeno a la solución DAB (la DAB en presencia de H₂O₂, y por acción de la peroxidasa, se oxida y adquiere un color marrón tabaco característico). Se

incubaban las secciones con esta solución durante 5 minutos y se vuelven a lavar tres veces, 5 minutos cada vez.

2.5.7 Contratación (contraste).

Las secciones se contratiñeron ligeramente con hematoxilina para facilitar la visualización de los núcleos celulares.

2.5.8 Deshidratación

De forma manual, una vez terminado el proceso automático de inmunotinción, las secciones se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes: 60% (30 seg), 70% (30 seg), 80% (30 seg), 90% (5 min), 96% (5 min), 100% (5 min). Por último, los portaobjetos se pasan por 3 cubetas de xilol, 1 minuto en cada una.

2.5.9 Montaje.

A cada cristal recién sacado y escurrido del xilol se le pone un cubreobjetos al que previamente se han añadido unas gotas de DPX (BDH Lab). Se eliminan las burbujas que se formen durante el montaje. Una vez secado se visualiza el resultado con el microscopio.

2.5.10 Control de calidad

Los controles de la especificidad anticuerpo policlonal del reactivo mediante un suero preabsorbido no se realizan como control de calidad, dado que los anticuerpos han sido validados para su uso por el laboratorio que los comercializa.

Se ha utilizado una muestra de control positivo conocido tanto para SP como para NK1R como control de calidad.

En la reacción catalizada por la peroxidasa (presente en el anticuerpo secundario) en presencia de H₂O₂, se produce la oxidación de la 3,3'-diaminobenzidina (DAB), que se deposita como un precipitado marrón en el lugar de la reacción antígeno-anticuerpo.

Se ha utilizado un reactivo de control negativo tanto para SP como para NK1R como control de calidad de técnica y especificidad de los anticuerpos.

2.6 VALORACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las muestras fueron valoradas e interpretadas una a una en colaboración con un

especialista en Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen de Valme, Sevilla. Para ello se siguió un sistema ciego de identificación de las muestras en el que no se conoce ningún dato del paciente en el momento de valorar cada muestra. Para cada uno de los 27 casos se valoraron 3 ítems de la histología de la amígdala, tanto para las muestras de SP como para las de NK1R, y en cada una de las muestras se valoró la intensidad y la extensión de la tinción en cada elemento histológico (tabla 13), empleando para ello una escala semicuantitativa previamente definida (tabla 14).

Tabla 13. Tabla de recogida de datos empleada para la valoración de cada una de las muestras de tejido amigdalár.

TEJIDO AMIGDALAR		SP		NK1R	
		Extensión	Intensidad	Extensión	Intensidad
EPITELIO		Núcleo			
		Citoplasma			
FOLÍCULO LINFOIDEO	Centro germinal	Núcleo			
		Citoplasma			
	Manto	Núcleo			
		Citoplasma			

Tabla 14. Escala semicuantitativa empleada para valorar la extensión e intensidad de la inmunotinción.

EXTENSIÓN	0 (nula)	1 (<10% del área cuantificada)	2 (10-60%)	3 (>60%)
INTENSIDAD	NEGATIVA (-)	DÉBIL (+)	MODERADA (++)	INTENSA (+++)

Se visualizaron las muestras mediante un microscopio Leica DM 2000, dotado con objetivos Leica NPLAN de diferentes aumentos (5x, 10x, 20x, 40x, 60x) y se obtuvieron las más representativas a través del scanner iScan HT 360 Roche-Ventana, empleando diferentes aumentos (10x, 20x, 40x, 100x, 200x, 400x). Para procesar las imágenes se utilizó el programa Ventana Image Viewer (versión 3.1.4, año 2012). El análisis descriptivo del estudio se llevó a cabo utilizando Microsoft Excel 2016.

IV. RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA DE ESTUDIO

Se dispone de 27 casos, de los cuales 10 eran niñas (37%) y 17 niños (63%). El rango de edad incluido comprendía entre los 3 y los 14 años. La media de edad fue de 5,96 años (figura 32).

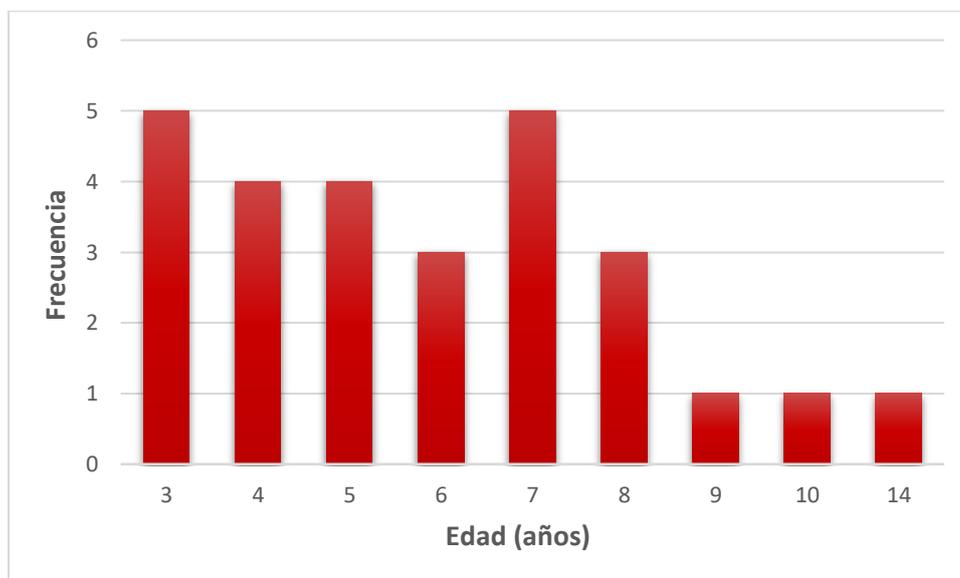


Figura 32. Representación gráfica de la distribución por edades.

2. EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA SP

Vamos a describir la expresión de la SP en las diferentes estructuras de la amígdala palatina en niños (figura 33). Diferenciaremos entre el epitelio y el folículo linfóide, y dentro de éste, entre el centro germinal y el manto. A su vez, queremos valorar la expresión tanto en el núcleo celular como en el citoplasma.

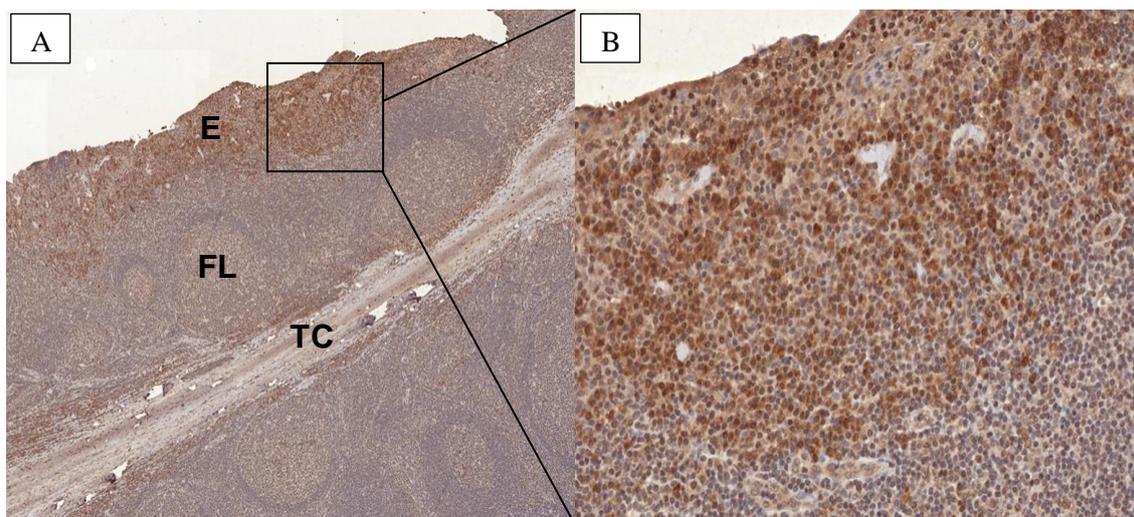


Figura 33. Inmunorreactividad de la SP en la amígdala palatina a diferentes aumentos. **A:** 40x. **B:** cripta amigdalina (fotografía con más aumento de la región delimitada en **A**). 200x. *E:* epitelio linforeticular. *FL:* folículo linfoideo. *TC:* tejido conectivo.

En la tabla 16 se expone un resumen de la inmunotinción nuclear y citoplasmática de la SP en las amígdalas estudiadas, según la escala semicuantitativa anteriormente explicada (véase tabla 14 del apartado 2.6 de Material y Métodos).

Tabla 16. Resumen de la inmunotinción de la SP en las amígdalas con amigdalitis recurrentes.

EXTENSIÓN	EPITELIO		CENTRO GERMINAL		MANTO	
	NÚCLEO	CITOPLASMA	NÚCLEO	CITOPLASMA	NÚCLEO	CITOPLASMA
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	14,81%(4)	14,81%(4)
1	18,52%(5)	51,85%(14)	18,52%(5)	85,19%(23)	51,85%(14)	85,19%(23)
2	51,85%(14)	29,63%(8)	77,78%(21)	14,81%(4)	33,34%(9)	0,00%
3	29,63%(8)	18,52%(5)	3,70%(1)	0,00%	0,00%	0,00%
INTENSIDAD						
-	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	14,81%(4)	14,81%(4)
+	55,56%(15)	55,56%(15)	85,19%(23)	77,78%(21)	85,19%(23)	81,49%(22)
++	40,74%(11)	44,44%(12)	14,81%(4)	22,22%(6)	0,00%	3,70%(1)
+++	3,70%(1)	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

EXTENSIÓN:	0 (nula)	1 (<10% del área cuantificada)	2 (10-60%)	3 (>60%)
INTENSIDAD:	NEGATIVA (-)	DÉBIL (+)	MODERADA (++)	INTENSA (+++)

2.1 Epitelio linforetico

En el epitelio linforetico la extensión de la SP fue mayor en el núcleo que en el citoplasma (figura 34).

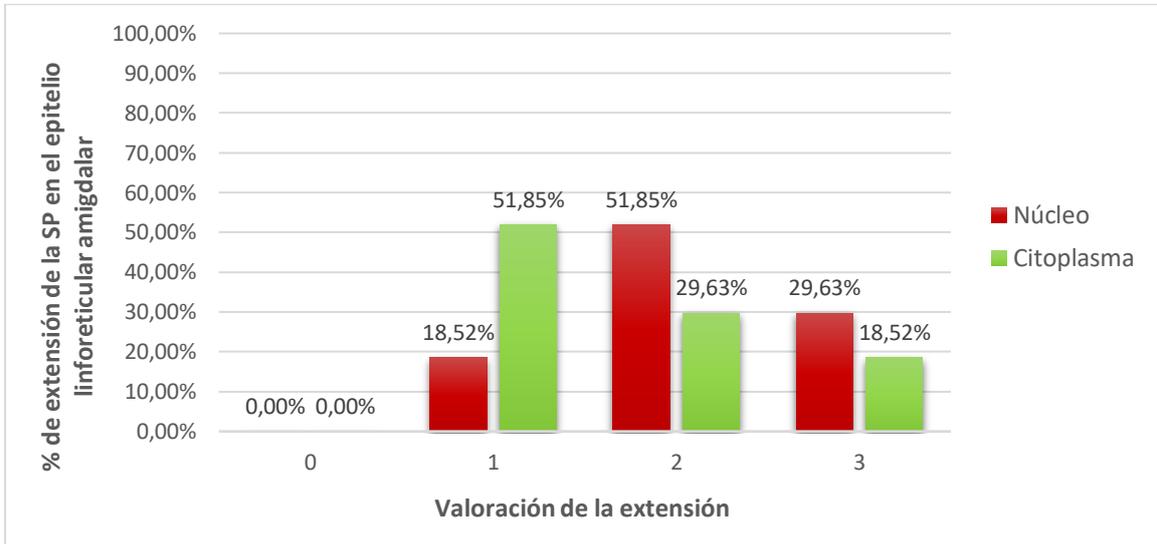


Figura 34. Representación gráfica del porcentaje de extensión de la SP en el epitelio linforetico amigdalino (0: nula inmunotinción; 1: <10%; 2: 10-60%; 3: >60% del área cuantificada).

Se realizó un inmunomarcaje de la SP en el epitelio linforetico de la amígdala palatina (figura 35).

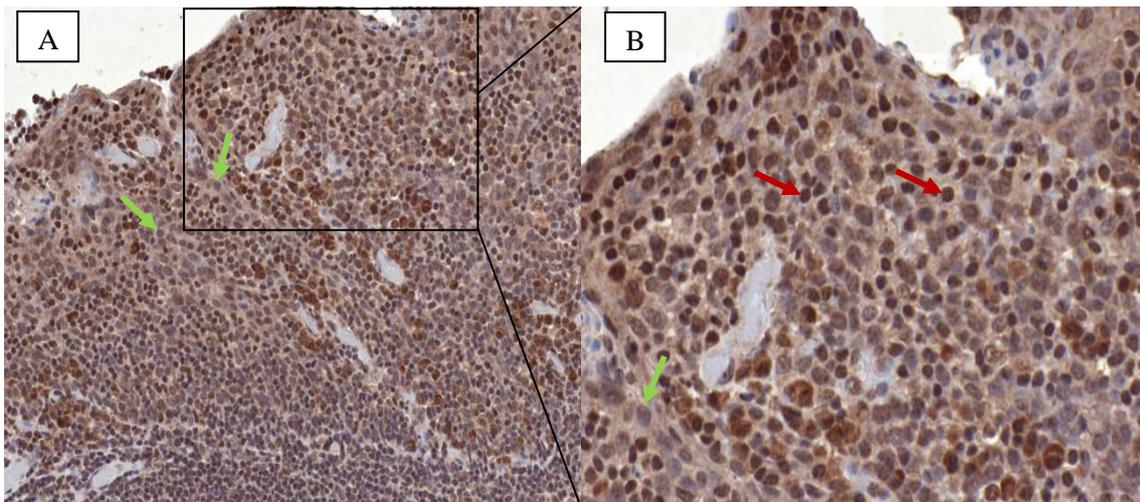


Figura 35. Expresión inmunohistoquímica de la SP en el epitelio linforetico de la amígdala a diferentes aumentos. **A**: 200x. **B**: Fotografía con más aumento de la región delimitada en **A**. 400x. Flechas verdes: células epiteliales. Flechas rojas: detalle de la expresión nuclear de la SP en linfocitos.

2.2 Folículo linfoideo

Diferenciaremos los dos componentes del folículo: centro germinal y manto.

2.2.1 Centro germinal

En el centro germinal la SP se expresó más en el núcleo que en el citoplasma, pues hubo mayor grado de extensión en los núcleos celulares (figura 36).

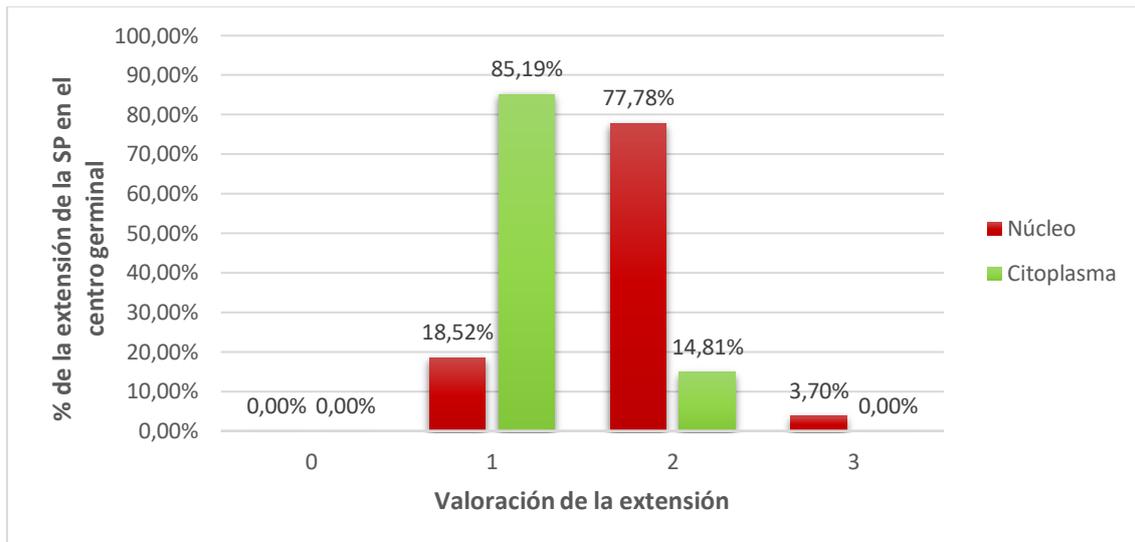


Figura 36. Representación gráfica del porcentaje de extensión de la SP en el centro germinal del folículo linfoideo amigdalario (0: nula inmunotinción; 1: <10%; 2: 10-60%; 3: >60% del área cuantificada).

La figura 37 representa la inmunotinción de la SP en el centro germinal del folículo linfoide de la amígdala palatina.

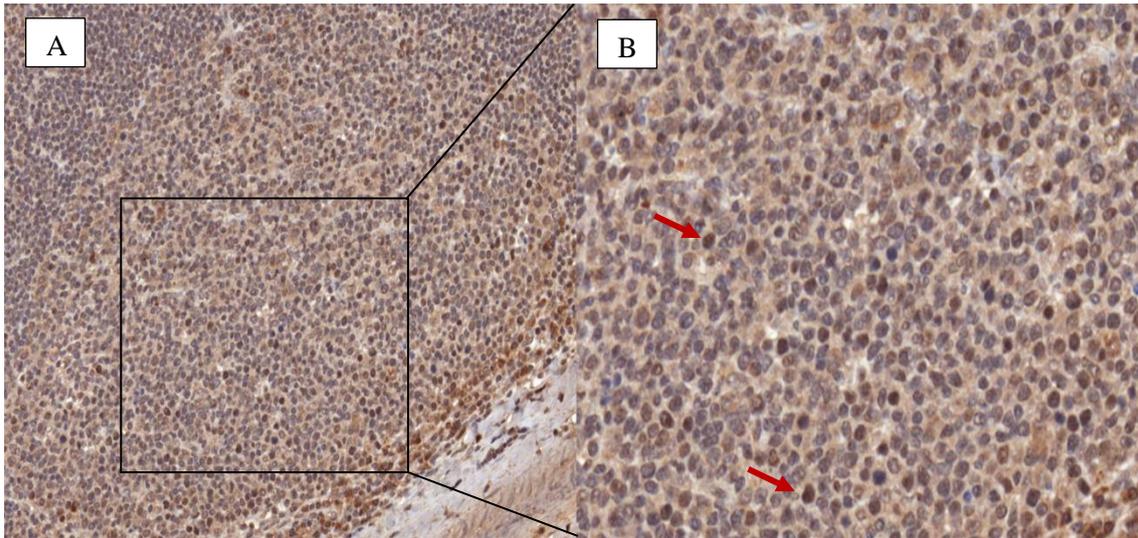


Figura 37. Expresión inmunohistoquímica de la SP en el centro germinal del folículo linfocitario amigdalino a diferentes aumentos. A: 200x. B: Fotografía con más aumento de la región delimitada en A. 400x. Flechas rojas: detalle de la inmunorreactividad nuclear de la SP en linfocitos.

2.2.2 Manto

En el manto la SP presentó una baja expresión, llegando a ser incluso nula en el 14,81% de los casos, tanto a nivel nuclear como citoplasmático (figura 38).

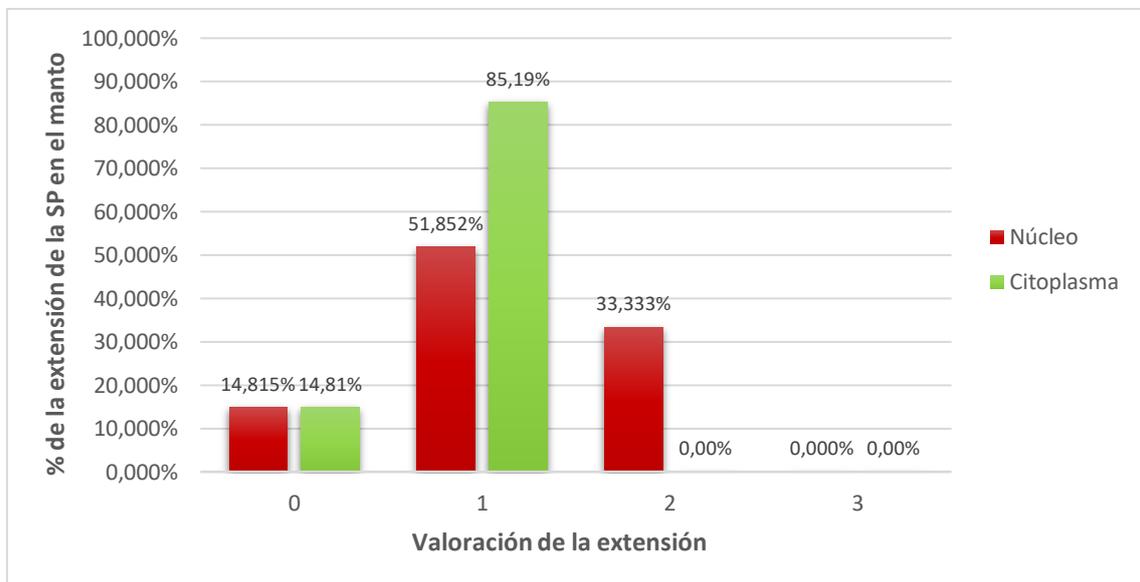


Figura 38. Representación gráfica del porcentaje de extensión de la SP en el manto del folículo linfocitario amigdalino (0: nula inmunotinción; 1: <10%; 2: 10-60%; 3: >60% del área cuantificada).

Se realizó un inmunomarcado de la SP en el manto del folículo linfocitario (figura 39).

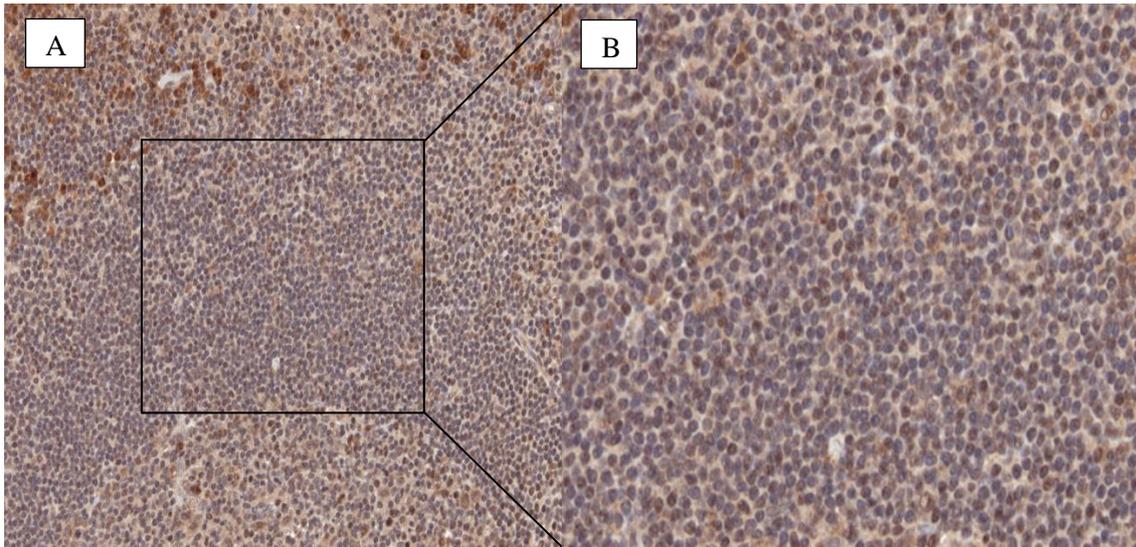


Figura 39. Expresión inmunohistoquímica de la SP en el manto del folículo linfoideo amigdalario a diferentes aumentos. **A:** 200x. **B:** Fotografía con más aumento de la región delimitada en **A.** 400x. Se puede observar la escasa expresión tanto nuclear como citoplasmática de la SP en los linfocitos.

En la figura 40 se resume la intensidad de la inmunorreactividad de la SP en el epitelio linforeticular, centro germinal y manto linfoideo amigdalario. En las diferentes estructuras la intensidad de la SP fue similar a nivel nuclear y citoplasmático. En el epitelio linforeticular resultó débil-moderada, en el centro germinal del folículo linfoideo débil mayoritariamente y en el manto la intensidad fue predominantemente débil e incluso negativa.

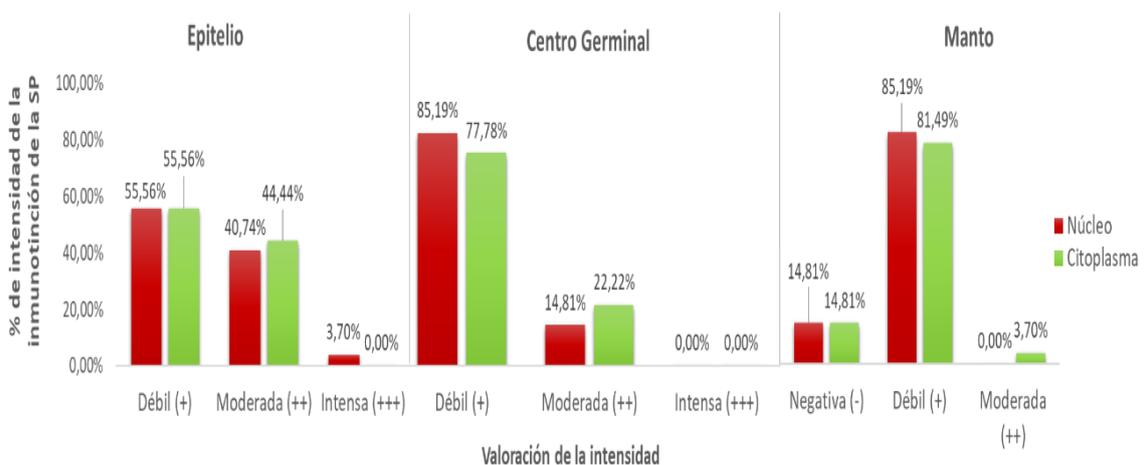


Figura 40. Representación gráfica del porcentaje de intensidad de inmunotinción de la SP en las diferentes estructuras amigdalares.

3. EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL NK1R

Vamos a describir la expresión del NK1R en las diferentes estructuras de la amígdala palatina en niños (figura 41). Diferenciaremos entre el epitelio y el folículo linfocitario, y dentro de éste, entre el centro germinal y el manto. A su vez, valoraremos la expresión del NK1R tanto en el núcleo celular como en el citoplasma.

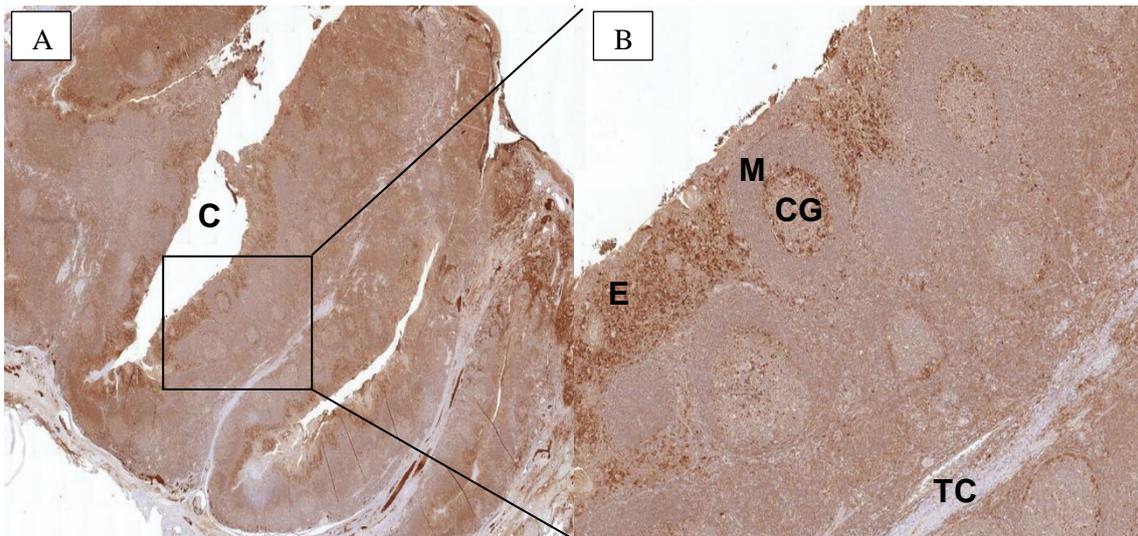


Figura 41. Inmunorreactividad del NK1R en la amígdala palatina a diferentes aumentos. **A:** 10x. **B:** Fotografía con más aumento de la región delimitada en **A**. 40x. **C:** cripta amigdalina **E:** epitelio linforeticular. **M:** manto. **CG:** centro germinal. **TC:** tejido conectivo.

En la tabla 17 se expone un resumen de la inmunotinción nuclear y citoplasmática del NK1R en las amígdalas estudiadas, según la escala semicuantitativa anteriormente explicada (véase tabla 14 del apartado 2.6 de Material y Métodos).

Tabla 17. Resumen de la inmunotinción del NK1R en las amígdalas con amigdalitis recurrentes.

EXTENSIÓN	EPITELIO		CENTRO GERMINAL		MANTO	
	NÚCLEO	CITOPLASMA	NÚCLEO	CITOPLASMA	NÚCLEO	CITOPLASMA
0	11,11%(3)	0,00%	7,41%(2)	0,00%	22,22%(6)	7,41%(2)
1	77,78%(21)	37,04%(10)	81,48%(22)	48,15%(13)	77,78%(21)	66,67%(18)
2	11,11%(3)	33,33%(9)	11,11%(3)	48,15%(13)	0,00%	22,22%(6)
3	0,00%	29,63%(8)	0,00%	3,70%(1)	0,00%	3,70(1)
INTENSIDAD						
-	7,41%(2)	0,00%	7,41%(2)	0,00%	14,81%(4)	7,41%(2)
+	81,48%(22)	40,74%(11)	81,48%(22)	29,63%(8)	85,19%(23)	74,07%(20)
++	11,11%(3)	37,04%(10)	11,11%(3)	37,04%(10)	0,00%	18,52%(5)
+++	0,00%	22,22%(6)	0,00%	33,33%(9)	0,00%	0,00%

EXTENSIÓN:	0 (nula)	1 (<10% del área cuantificada)	2 (10-60%)	3 (>60%)
INTENSIDAD:	NEGATIVA (-)	DÉBIL (+)	MODERADA (++)	INTENSA (+++)

3.1 Epitelio linforetico

En el epitelio linforetico el NK1R se expresó más en el citoplasma, donde la valoración de la extensión fue mayor que en el núcleo (figura 42).

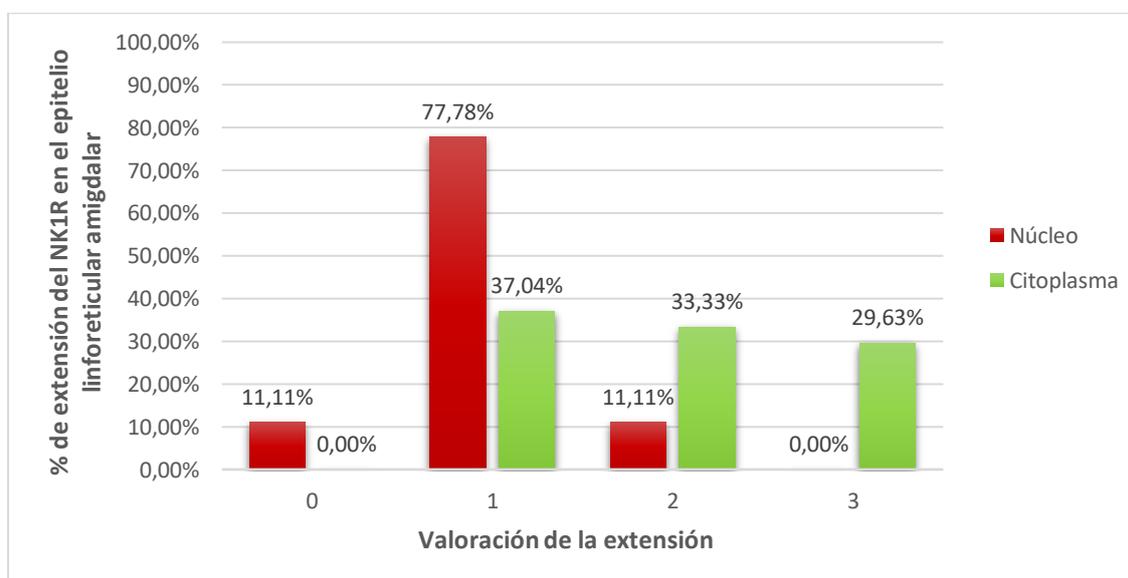


Figura 42. Representación gráfica del porcentaje de extensión del NK1R en el epitelio linforetico amigdalario (0: nula inmunotinción; 1: <10%; 2: 10-60%; 3: >60% del área cuantificada).

Se realizó un inmunomarcaje del NK1R en el epitelio linforetico amígdalar (figura 43).

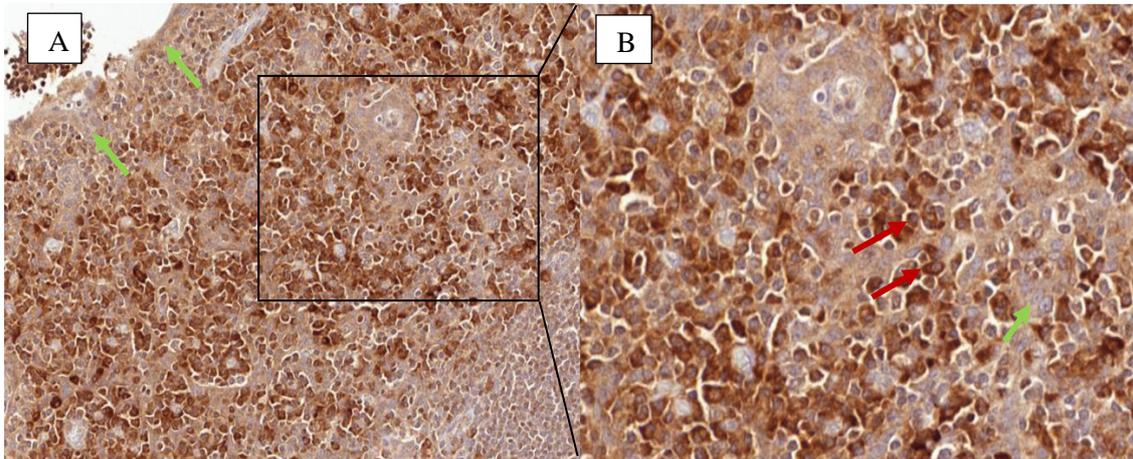


Figura 43. Expresión inmunohistoquímica del NK1R en el epitelio linforetico de la amígdala con diferentes aumentos. **A:** 200x. **B:** Fotografía con más aumento de la región delimitada en **A**. 400x. Flechas verdes: células epiteliales. Flechas rojas: detalle de la mayor inmunorreactividad del NK1R en el citoplasma de las células linfoides.

3.2. Foliculo linfoideo

3.2.1 Centro germinal

En el centro germinal del foliculo linfoideo el NK1R presentó una mayor expresión en el citoplasma que en el núcleo celular, donde la valoración de la extensión fue menor (figura 44).

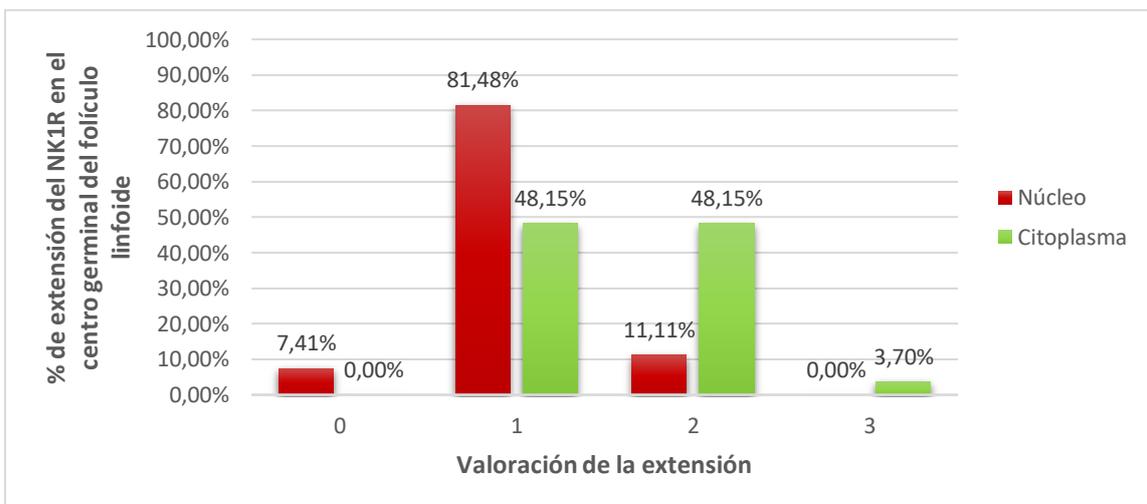


Figura 44. Representación gráfica del porcentaje de extensión del NK1R en el centro germinal del foliculo linfoide amígdalar (0: nula inmunotinción; 1: <10%; 2: 10-60%; 3: >60% del área cuantificada).

La figura 45 muestra el inmunomarcaje que se realizó del NK1R a nivel del centro germinal del folículo linfoideo amigdalal.

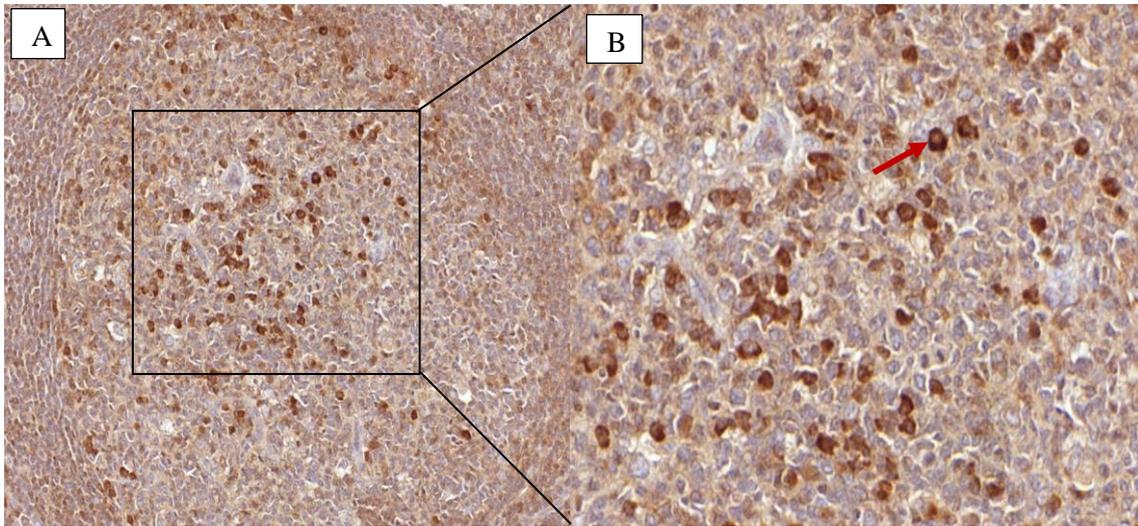


Figura 45. Expresión inmunohistoquímica del NK1R en el centro germinal del folículo linfoide amigdalal con diferentes aumentos. **A:** 200x. **B:** Fotografía con más aumento de la región delimitada en **A**. 400x. Flecha roja: detalle de la intensa expresión del NK1R en el citoplasma del linfocito.

3.2.2 Manto

En el manto encontramos una baja expresión del NK1R, sobre todo a nivel nuclear (figura 46).

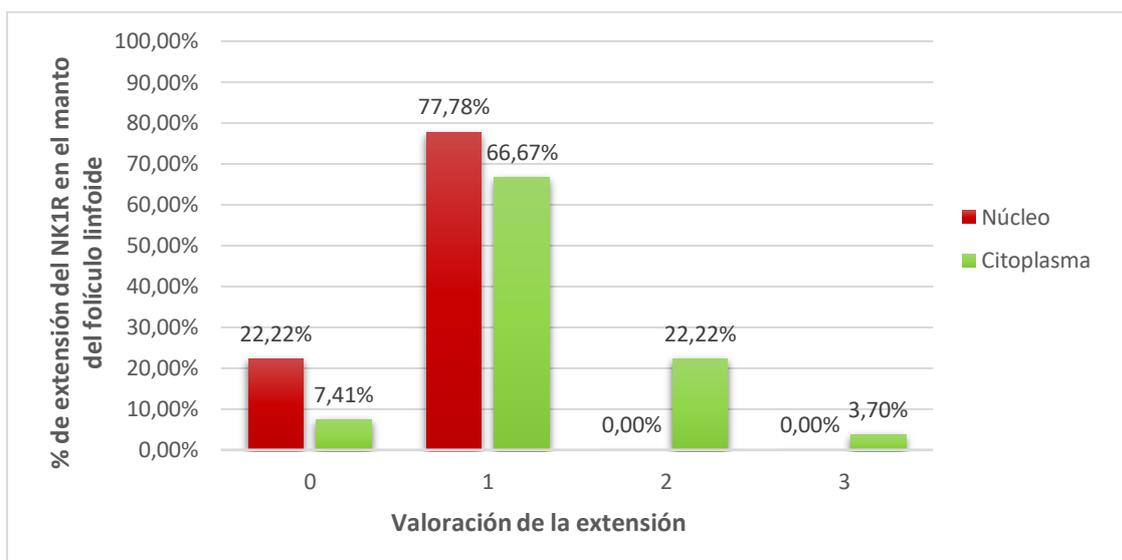


Figura 46. Representación gráfica del porcentaje de extensión del NK1R en el manto del folículo linfoide amigdalal (0: nula inmunotinción; 1: <10%; 2: 10-60%; 3: >60% del área cuantificada).

Se realizó la inmunotinción del NK1R en el manto del folículo linfoideo (figura 47).

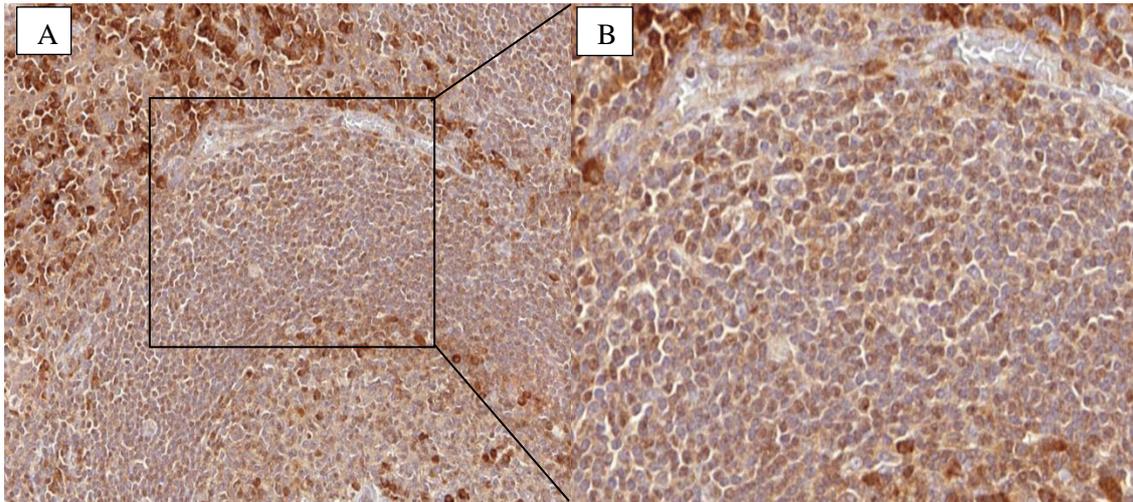


Figura 47. Expresión inmunohistoquímica del NK1R en el manto del folículo linfoide amigdalario con diferentes aumentos. **A:** 200x. **B:** Fotografía con más aumento de la región delimitada en **A.** 400x. Se puede apreciar la escasa inmunorreactividad del NK1R en las células del manto linfoideo.

En la figura 48 se resume la intensidad de la inmunorreactividad del NK1R en el epitelio linfocitario, centro germinal y manto linfocitario amigdalario. Se puede apreciar que la intensidad fue mayor en el citoplasma que en el núcleo en las tres estructuras y que en el manto la intensidad fue mucho menor a nivel de citoplasma que en el epitelio o en el centro germinal.

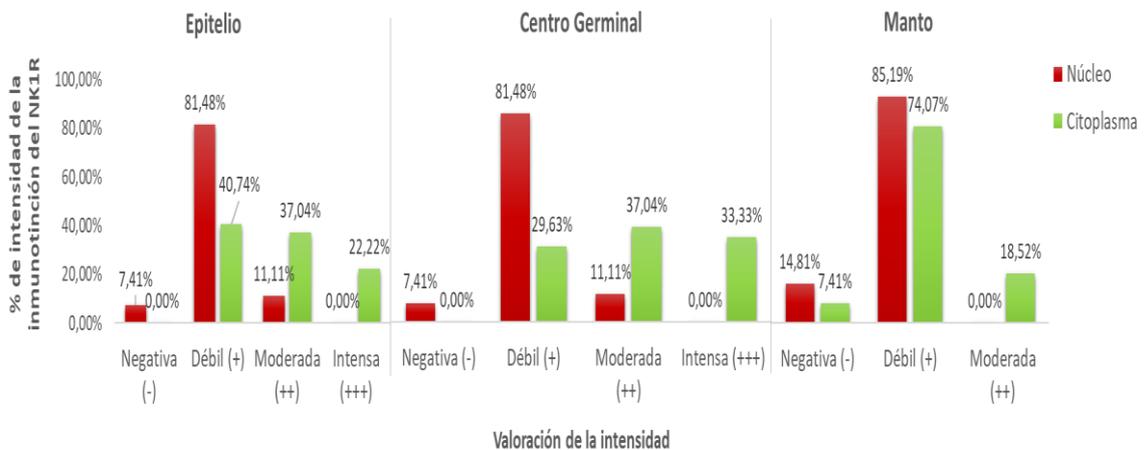


Figura 48. Representación gráfica del porcentaje de intensidad de inmunotinción del NK1R en las diferentes estructuras amigdalares.

3. CONTROLES NEGATIVOS

La figura 49 ilustra imágenes de los controles negativos de SP y NK1R (muestras en las que no se ha añadido el anticuerpo primario) realizados como control de calidad de técnica y especificidad de los anticuerpos en las muestras de tejido amigdalár.

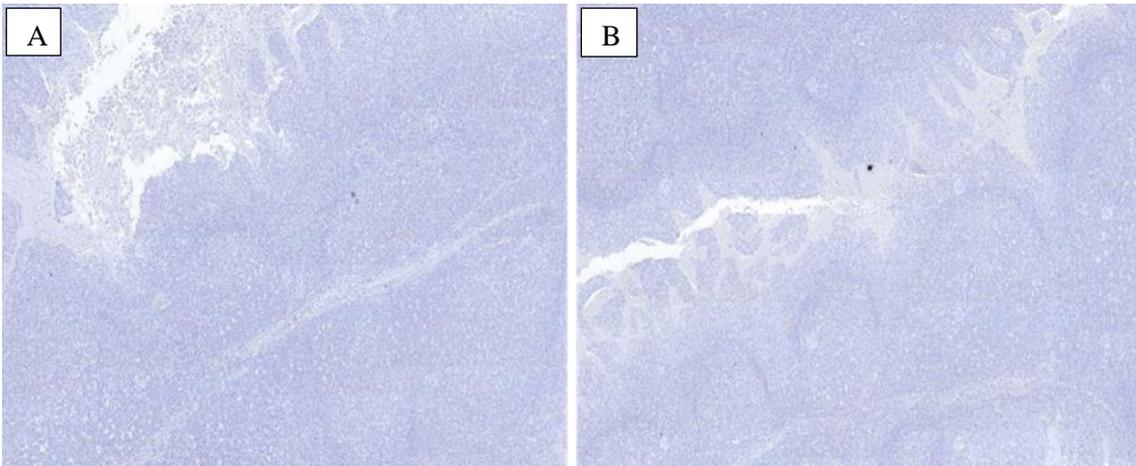


Figura 49. Imágenes de controles negativos de SP (A) y NK1R (B) 40x.

4. TINCIÓN CON HEMATOXILINA/EOSINA

La tinción con hematoxilina-eosina de cada caso estudiado permitió corroborar la adecuada conservación y estructura del tejido amigdalár, descartando la presencia de alteraciones histológicas importantes (figura 50).

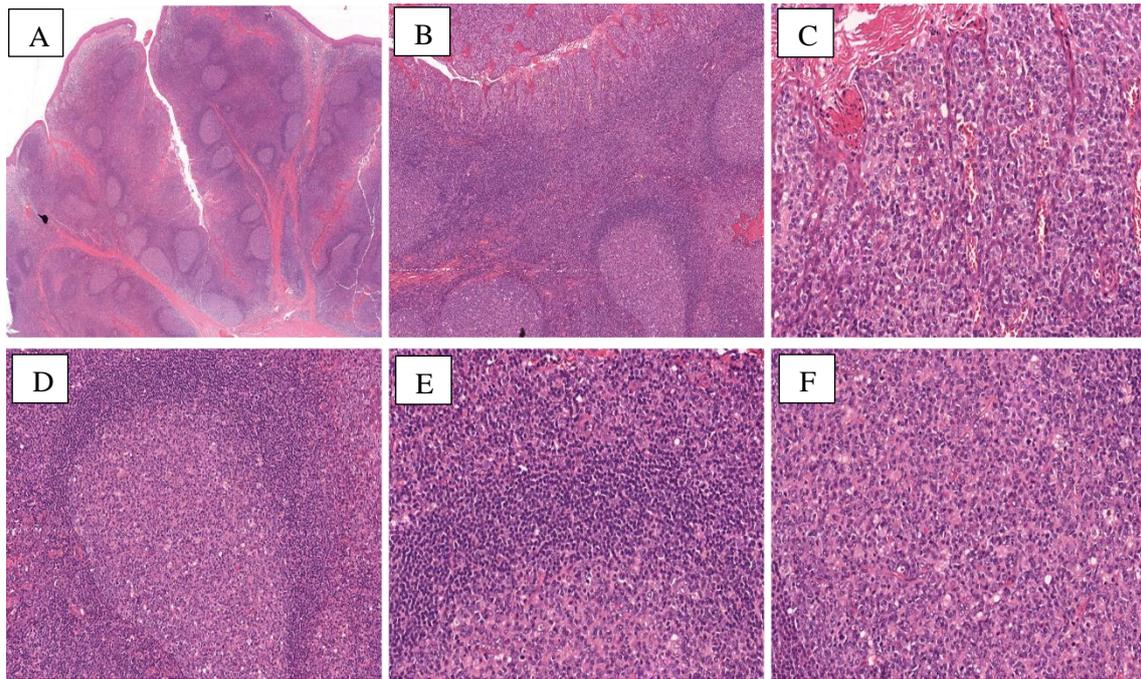


Figura 50. Imágenes de la tinción hematoxilina-eosina del tejido amigdalario a diferentes aumentos. **A:** 10x. **B:** 40x. **C:** cripta amigdalina 200x. **D:** folículo linfoide 100x. **E:** manto 200x. **F:** centro germinal 200x.

V. DISCUSIÓN

Las TK constituyen un grupo de NP ampliamente distribuido en todas las especies animales estudiadas, entre las que destacan diversos mamíferos como el hombre. Están formadas por un conjunto de péptidos que comparten una secuencia común ([Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂](#)) y participan en diversas funciones celulares, tanto a nivel neuronal como no neuronal, destacando el papel que desempeñan en la regulación del sistema inmune y la inflamación. Entre las TK tiene un papel destacado la SP, ligando natural del receptor taquicinérgico NK1. En las últimas décadas se ha demostrado la participación de este complejo SP/NK1R en diversas funciones fisiológicas y fisiopatológicas entre las que cabe destacar la inflamación neurogénica, el dolor, diversos trastornos neurológicos a nivel central, funciones cardiovasculares, la génesis y propagación del cáncer o su papel en diversas enfermedades de carácter inflamatorio y autoinmune.

Las amígdalas palatinas son órganos de tejido linfoide, que junto al resto de componentes del anillo de Waldeyer, tienen un papel inmunocompetente fundamental como primera línea de defensa en nuestro organismo. Su función radica en proteger la mucosa del tracto aerodigestivo de agresiones externas. Por tanto, las amígdalas constituyen un órgano diana de patología inflamatoria e infecciosa.

Las células inmunes como neutrófilos, macrófagos, eosinófilos o linfocitos expresan SP y NK1R⁷⁶, que es el receptor taquicinérgico de mayor especificidad para la SP. A su vez, la SP actúa regulando la función de las células inmunitarias de nuestro organismo, contribuyendo así a la inflamación y a la inmunidad.

Por este motivo nos planteamos, antes de realizar este trabajo que, de manera análoga a lo que ocurre en otros procesos inflamatorios e infecciosos, es muy probable que la SP y su receptor NK1 se sobreexpresen en las amigdalitis recurrentes y desempeñen un papel etiopatogénico destacado en esta patología inflamatoria, lo que supondría un avance en el conocimiento de su fisiopatología y a su vez, la apertura de una puerta hacia nuevos planteamientos terapéuticos.

Con este fin y como punto de partida para posteriores trabajos de investigación, nos planteamos la hipótesis de este estudio, con la que pretendíamos conocer cuál es el patrón de expresión de la SP y NK1R en las amígdalas palatinas que han sufrido infecciones recurrentes.

Diseñamos un estudio descriptivo anatómico-morfológico de expresión inmunohistoquímica valorada de forma semicuantitativa sobre una población de estudio elegida en base a los criterios de inclusión y exclusión antes descritos.

Durante el procesamiento de las muestras se realizaron los pertinentes controles de calidad (control negativo y control positivo) para demostrar la especificidad de la técnica inmunohistoquímica empleada.

Además, en todos los casos observamos que el patrón de inmunorreactividad tanto de la SP como del NK1R se circunscribe y coincide con estructuras anatómicas e histológicas, a diferencia de lo que ocurriría con los artefactos.

Todo esto nos sirve como validación para poder afirmar que los resultados de la expresión inmunohistoquímica reflejan la existencia real en dichos tejidos tanto de la SP como del NK1R.

Para la valoración e interpretación de los resultados se empleó un sistema ciego que garantizara en el momento de visualizar las diferentes muestras al microscopio, que no se conociera ninguna característica del sujeto del que procedían, con el fin de objetivar dicha interpretación y evitar cualquier sesgo derivado de un condicionamiento subjetivo previo por parte del observador. Además, el empleo de una escala semicuantitativa para la valoración de la extensión e intensidad de la inmunorreactividad permitió homogeneizar y objetivar en mayor medida los resultados obtenidos entre los diferentes casos del estudio.

La demostración de la expresión tanto de la SP como del NK1R en tejido amigdalares afecto de infecciones recurrentes establece las bases para profundizar en la comprensión de la fisiopatología amigdalares y abriría la puerta para un nuevo abordaje terapéutico basado en el bloqueo del NK1R a través de sus antagonistas específicos. Hubiera sido interesante analizar la expresión de SP/NK1R en tejido amigdalares sano, pero, por razones obvias, es muy difícil conseguir este tipo de muestras.

En la bibliografía actual solo hemos encontrado dos estudios que analizan la expresión de SP/NK1R en amigdalitis recurrentes.

En el primero de ellos, **Goldbart et al**²⁰⁸ determinaron la concentración de SP y NK1R mediante ELISA en tejido adenoamigdalares de niños con SAOS e infecciones amigdalares

recurrentes (IR) y de NK1R mediante inmunohistoquímica. Demostraron que en el SAOS hay un aumento de la SP y de su receptor, NK1R, respecto a IR, donde están disminuidos.

En el segundo estudio, **Gozal et al**²⁰⁹ comprobaron que la SP producía de una manera concentración-dependiente un aumento de la proliferación de las células amigdalares en niños con SAOS, pero no en niños con IR. Además, vieron que el uso de un antagonista del NK1R, el GR-82334, a una concentración de 10^{-6} M, disminuía la respuesta proliferativa celular en el grupo con SAOS, pero no en IR.

Por otro lado, en condiciones basales, constataron que en el tejido amigdalares del grupo con SAOS había mayores concentraciones de IL-1 β , TNF α e IL-6 que en el del grupo con IR. Y al añadir SP se producía un incremento de IL-1 β y TNF α en SAOS, pero en IR solo un leve aumento de IL-1 β . Este efecto era bloqueado por el antagonista del NK1R, que redujo las concentraciones de estas citoquinas en ambos grupos.

Se sabe que la SP es un mitógeno natural fundamental, y produce proliferación celular tanto en células sanas (células del tejido conectivo¹²², sinoviocitos¹⁷⁵, fibroblastos²¹¹ y linfocitos²¹²), como en células tumorales, de una manera dependiente de la concentración. Numerosos trabajos, entre los que destacan los realizados por el grupo del Dr. Muñoz, han puesto de manifiesto que tanto la SP como el NK1R se sobreexpresan en diferentes tipos de tumores y que la SP induce la proliferación de las células tumorales y la mitogénesis^{179,180,181,182,183,184,186}.

Igualmente, se ha comprobado la capacidad de la SP para estimular la neovascularización a través de la inducción de proliferación endotelial¹⁷⁶.

En el estudio de Gozal et al²⁰⁹, al agregar SP al tejido amigdalares, se observa que en el grupo de SAOS se produce un aumento de la proliferación celular, pero no en IR. Según los autores, esto puede significar que las vías de proliferación amigdalares en SAOS y en IR sean diferentes. Obviamente, es conocido que la SP solo actúa cuando se une específicamente a NK1R y, además, es concentración dependiente, es decir, cuando hay mayor cantidad de NK1R, la concentración de SP es mayor.

Como dice el estudio, la concentración de NK1R en IR es menor que en SAOS. Por tanto, al haber menor concentración de NK1R la SP tiene menor actividad. Por eso cuando se testa la actividad de la SP en la proliferación de las células amigdalares es alta en SAOS (existe aumento de NK1R) y baja en IR.

Respecto al SAOS, es interesante el hecho de que al presentar mayor nivel de expresión de NK1R, la SP tiene mayor actividad, por lo que producirá un incremento en la

proliferación de células amigdalares. Obviamente el tratamiento con antagonistas de los NK1R disminuirá esa proliferación celular, así como la hipertrofia amigdalares en el SAOS.

Es conocida la capacidad de la SP de regular la liberación de citoquinas inflamatorias en las células inmunes¹⁷⁰. En el estudio que comentamos, en condiciones basales, la SP libera esas citoquinas en el SAOS, pero no en IR, en general, salvo un leve aumento de IL-1 β . Esto puede significar que haya un sustrato patológico en niños con IR en los que las amígdalas no tienen la capacidad de defensa para combatir infecciones.

Igualmente, en las IR se expresa menos NK1R en las células amigdalares por causas actualmente desconocidas, por lo que, el efecto de las interleuquinas inflamatorias IL-1 β , TNF α e IL-6, al estar reguladas por la SP, es mucho menor en IR que el que se produce en el SAOS. Con esto, la capacidad de respuesta inflamatoria y antiinfecciosa está disminuida. De ahí que estos niños tengan mayor riesgo de padecer infecciones amigdalares recurrentes.

El antagonista del NK1R empleado en el estudio, el GR-82334, disminuye la concentración de IL-1 β y TNF α tanto en SAOS como en IR, no afectando a la liberación de IL-6 (valor no significativo). A pesar de la menor cantidad de NK1R en IR, los antagonistas del NK1R disminuyen la liberación de citoquinas. Por tanto, es posible que la liberación de citoquinas no esté en relación con la concentración de NK1R, es decir, no es necesario una elevada concentración de NK1R para que se produzca liberación de citoquinas. Sin embargo, para que se produzca proliferación celular sí es necesario mayor cantidad de NK1R. Por consiguiente, los antagonistas del NK1R actúan de una manera concentración dependiente: a menor concentración de NK1R, los antagonistas inhiben la liberación de citoquinas y, a mayor concentración, inhiben la proliferación celular.

En nuestro estudio, la **SP** se expresó en todas las muestras, tanto en el núcleo como en el citoplasma celular del epitelio linforetico, predominando en el núcleo, ya que hubo mayor grado de extensión que en el citoplasma (ver figura 34). A nivel del centro germinal del folículo linfoide la SP presentó una expresión mayoritariamente nuclear, aunque el grado de extensión fue menor que en el epitelio. Por último, encontramos muestras en las que no se detectó inmunomarcaje de la SP en el manto linfoideo. Aún así, la expresión de la SP en el manto resultó predominantemente nuclear, pero con mucho menor grado de extensión que en el centro germinal (figura 38).

Respecto a la intensidad de la detección inmunohistoquímica de la SP no hubo grandes diferencias entre núcleo y citoplasma, pero sí entre las distintas estructuras amigdalares. La intensidad de la SP fue débil fundamentalmente tanto en núcleo como en citoplasma en el epitelio, centro germinal y manto, sin embargo, en el epitelio llegó a ser moderada en un porcentaje alto de las muestras y, por el contrario, en el manto llegó a ser negativa en otro pequeño número de muestras (ver figura 40).

En resumen, la expresión de la SP en las amígdalas palatinas de niños con amigdalitis recurrentes predominó en el núcleo celular y el orden de expresión fue:

Epitelio linforeticular > Centro Germinal > Manto

La expresión del **NK1R** en el epitelio linforeticular predominó en el citoplasma, llegando a ser incluso nula en el núcleo en un reducido porcentaje de las muestras (ver figura 42). A nivel del centro germinal del folículo linfoide el NK1R presentó una expresión mayoritariamente citoplasmática, aunque el grado de extensión fue menor que en el epitelio linforeticular. Finalmente, en el manto linfoideo también predominó la expresión citoplasmática del NK1R, sin embargo, llegó a ser negativa en un pequeño porcentaje de las muestras (ver figura 46).

Respecto a la intensidad de la detección inmunohistoquímica del NK1R fue mayor en el citoplasma que en el núcleo en las tres estructuras, y el grado de intensidad fue muy similar entre epitelio y centro germinal. Por el contrario, en el manto el nivel de intensidad descendió considerablemente, incluso se encontraron muestras negativas para intensidad de NK1R citoplasmático (ver figura 48).

Por tanto, la expresión del NK1R en las amígdalas palatinas de niños con amigdalitis recurrentes predominó en el citoplasma celular y el orden de expresión fue:

Epitelio linforeticular > Centro Germinal > Manto

La casi inexistente expresión de NK1R descrita en el interior del núcleo de las células amigdalares podría ser interpretado como que realmente no existen o bien que este hallazgo fuera consecuencia de una limitación de la técnica inmunohistoquímica. Un argumento a favor de esta segunda hipótesis es el hecho de que se haya descrito la presencia intranuclear de NK1R en otros tipos de células que también expresan SP, como son las células tumorales del cáncer de pulmón (tanto de células pequeñas como no pequeñas)¹⁸⁴ o las neuronas y células gliales de pacientes con esclerosis mesial temporal⁹⁹.

Además, al ser la SP el ligando natural de NK1R, el hecho de encontrar una expresión más intensa de esta primera dentro del núcleo llevaría en cierta manera implícita “la necesidad” de que esté presente su receptor para que pueda realizar a través de él sus funciones, resultando difícil explicar la existencia de SP a nivel intranuclear de manera independiente a la de su receptor. Por otro lado, en tejido sano como es la placenta humana normal se ha descrito que el NK1R se expresa en el interior nuclear con una intensidad mucho menor a la que presenta la SP¹⁵³.

Teniendo en cuenta todo esto consideramos que es lógico que el NK1R deba existir en el interior nuclear tanto en cuanto la SP está presente y, por tanto, el hecho de no haberlo encontrado debe obedecer a una limitación en la sensibilidad de la técnica inmunohistoquímica.

Así mismo, hay que destacar que la localización de la SP no sólo en el citoplasma celular sino también en los núcleos celulares es interesante, pues hace pensar que la función de la SP no es sólo la de un NT, sino que la SP también podría funcionar como un modulador genético que actúa directamente sobre el ADN nuclear¹⁵³. Más adelante se podría determinar el modo de acción de la SP una vez es internalizada en el núcleo, ya que en el interior debe actuar mediante otros mecanismos moleculares desconocidos hasta el momento. Además, se conoce que la SP se expresa en el núcleo de las células tumorales (como el cáncer de pulmón¹⁸⁴ y de mama²¹³).

La localización de un péptido en estructuras celulares indica, a priori, que el péptido estaría implicado en las funciones de esa estructura. Por tanto, y volviendo a nuestro estudio, la expresión de SP en el núcleo de las células amigdalares podría regular la actividad nuclear de dichas células actuando como un factor neuroepigenético, del mismo modo, esto ha sido publicado en células del cáncer²¹⁴.

Por otro lado, es conocido que la SP regula varios factores de transcripción como son NF- κ B relacionado con la inflamación (pues regula muchas citoquinas inflamatorias^{215,216}), quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2) relacionadas con la mitogénesis, c-fos, c-jun y la proteína activadora-1 (AP-1) relacionados con la mitogénesis y la diferenciación celular^{217,218,219}.

La localización de SP en el núcleo estaría regulando la expresión génica de las células amigdalares de dos formas: indirectamente a través de los factores de transcripción anteriormente mencionados y directamente a través de la unión al NK1R.

La acción mitogénica mediada por SP no es del todo conocida. Una vez que el receptor es activado por su ligando, la SP, el NK1R activa miembros de la cascada MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos), incluyendo las quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2) y la p38MAPK (véase figura 26). Estas rutas son a menudo activadas bajo distintas condiciones y pueden llevar tanto a la apoptosis celular como al crecimiento^{220,221}. Los mecanismos por los cuales se transmiten estas señales aparentemente contradictorias no son conocidos, aunque los complejos de proteínas estructurales que determinan la localización subcelular y la consecuente especificidad de las proteínas de señalización pueden proporcionar una explicación^{222,223,224}. El mecanismo principal por el que los RAPGs activan la ruta MAPK es por la liberación de las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G²²³. La SP induce la formación de un complejo multiproteico que contiene NK1R, β -arrestina, src y ERK1/2, que se forma cerca de la membrana plasmática. Una vez activado, ERK1/2 se transloca en el núcleo de tal modo que se induce la proliferación y protege a la célula de la apoptosis²²².

Recientemente, se han publicado varios artículos en relación con la localización del NK1R en el núcleo de la célula. El Dr. Muñoz et al.²²⁵ han demostrado mediante técnicas de inmunofluorescencia la presencia de SP y NK1R tanto en el núcleo como en el citoplasma de células madre adiposas en ratas y en humanos, siendo incluso la concentración de NK1R mayor en el núcleo que en el citoplasma. Además, en este estudio se ha objetivado que durante la mitogénesis celular hay un incremento de NK1R en el núcleo de las células, lo que sugiere la implicación del NK1R en la mitogénesis celular. Por otro lado, también han demostrado las diferentes localizaciones subcelulares de las distintas isoformas del NK1R. Así, el NK1R truncado (NK1R-T) se encuentra solo en el citoplasma, mientras que la forma larga del NK1R (NK1R-F) está tanto en citoplasma como en el núcleo. Por consiguiente, la presencia de SP y NK1R en el núcleo sugiere que ambos están implicados en la función nuclear de la célula.

Otro estudio actual²²⁶ ha demostrado también mediante técnicas de inmunofluorescencia en un modelo in vitro que en la infección producida por el virus varicela zóster (VVZ) en astrocitos espinales humanos, el NK1R emigra al núcleo celular, en ausencia de su ligando SP, lo que se asoció con la propagación viral. Y los antagonistas de NK1R aprepitant y rolapitant inhiben este efecto, lo que proporcionaría alternativas terapéuticas prometedoras en el tratamiento de infecciones por VVZ²²⁶.

Volviendo a nuestro estudio, basándonos en los estudios anteriores, la SP regularía las células que componen la amígdala, tanto por su presencia en el núcleo (actuando sobre el ADN nuclear, regulando la mitogénesis y diferenciación celular), como en el citoplasma (regulando, por ejemplo, la liberación de citoquinas proinflamatorias).

Por otro lado, hemos detectado que la expresión tanto de SP como de NK1R en las amígdalas afectas de infecciones recurrentes es mayor en el epitelio linforeticular que en el folículo linfoide. Sabemos que en el epitelio se encuentran las células epiteliales, células presentadoras de antígenos y los linfocitos, cuya función es exponerse a antígenos que acceden a través del tracto aerodigestivo. Como después desarrollaremos en cada tipo de célula, la SP es un factor importante en la generación de la respuesta inflamatoria y la activación del sistema inmune, de ahí que, en el epitelio, que es donde se inicia todo el proceso, la inmunodetección sea mayor que en el folículo linfoide.

En el centro germinal del folículo linfoide hemos detectado mayor expresión de SP y NK1R que en el manto. Los centros germinales contienen linfocitos en diferentes estadios evolutivos y células dendríticas presentadoras de antígeno. La función del centro germinal es la replicación y diferenciación de las células precursoras linfoides, por lo que la SP presenta un papel fundamental en este proceso y promueve la proliferación de linfocitos, como después veremos.

El manto del folículo linfoide es una zona linfoide pura que solo contiene linfocitos maduros. En este tejido la expresión de la SP y NK1R es reducida, pues hay menor actividad proliferativa.

La SP es un mediador clave en la **inflamación neurogénica**¹⁷⁴ que se produce en órganos periféricos como consecuencia de la respuesta nociceptiva de las neuronas aferentes primarias sensibles a capsaicina, ante estímulos nocivos, mecánicos o químicos¹⁷³. Como ya se ha comentado, la inflamación neurogénica consiste en un fenómeno de vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar, extravasación de plasma e infiltración granulocítica (véase figura 29).

La SP es un potente vasodilatador en tejidos periféricos, reproduce muchos de los cambios fisiológicos observados en la inflamación aguda, por ejemplo, la extravasación de plasma. El edema inducido por la SP se debe principalmente al aumento de la permeabilidad vascular, mediado a través de su acción sobre los NK1R situados en las células endoteliales de vénulas postcapilares²²⁷. La dilatación de las células endoteliales

inducida por la SP y la posterior extravasación de plasma permiten que la bradicinina y la histamina accedan al sitio de la lesión y a los terminales nerviosos aferentes.

Por otro lado, la SP contribuye al reclutamiento de leucocitos en los procesos inflamatorios²²⁸ y, además, estimula específicamente la quimiotaxis de linfocitos, monocitos, neutrófilos y fibroblastos^{229,230,231}.

La SP no es solo sintetizada y secretada por células nerviosas; monocitos, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, linfocitos y mastocitos también sintetizan este péptido. La mayoría de células inmunes que producen SP también expresan NK1R²³².

La SP incrementa la proliferación de linfocitos y la producción de inmunoglobulinas, y aumenta la secreción de citoquinas por parte de linfocitos, monocitos, macrófagos y mastocitos^{233,234,235,236,237,238,239,240,241,242}. La liberación de mediadores inflamatorios (tales como citoquinas, radicales de oxígeno, derivados del ácido araquidónico e histamina) inducida por la SP, potencia la lesión tisular y estimula un mayor reclutamiento de leucocitos, amplificando así la respuesta inflamatoria²⁴³.

En nuestro estudio, hemos detectado la presencia de SP y NK1R tanto en linfocitos como en células epiteliales, aunque la expresión es más intensa en linfocitos. Vamos a detallar la función que ejerce la SP y el NK1R en las distintas estirpes celulares que encontramos en la amígdala: linfocitos, células epiteliales y células presentadoras de antígenos, como macrófagos-monocitos y células dendríticas.

LINFOCITOS

La SP regula la función de los linfocitos²⁴⁴. Por un lado, la SP estimula la proliferación de linfocitos T humanos²¹². Los linfocitos T inactivos no expresan SP ni su receptor, pero se ha mostrado que los linfocitos T humanos activados expresan el gen Ppt-a y producen SP¹⁰¹. De manera similar, en roedores, las células T activadas expresan NK1R, y la SP liberada de las células T activadas puede actuar de manera autocrina para regular la proliferación de células T¹⁶⁹.

Por otro lado, la SP es un potente quimioatrayente²²⁷, es capaz de activar varias células inmunitarias, como los linfocitos T CD4+ y CD8+, los mastocitos, las células NK y los macrófagos. La SP puede activar la IL-8, demostrando su participación en la quimioatracción de células inmunitarias²⁴⁵. En los linfocitos T activados, la SP regula

positivamente la expresión de la proteína inflamatoria de macrófagos-1 β (MIP-1 β), una β -quimioquina que promueve la migración de linfocitos y monocitos al sitio de la inflamación²⁴⁶. Un antagonista específico del NK1R, CP-96,345, bloquea este efecto²⁴⁶.

Como ya se ha comentado, la SP regula la secreción de inmunoglobulinas^{233,235,237} y citoquinas^{237,238} por parte de los linfocitos. La SP aumenta la expresión de IL-2 en células T humanas activadas²³⁸.

Se ha publicado que la IL-12 aumenta la producción de SP de las células T murinas, mientras que la IL-10 la bloquea²⁴⁷. La IL-12 también induce la expresión de NK1R en células T murinas²⁴⁸. La reducción de la SP en roedores mediante la administración de capsaicina o el tratamiento con un antagonista de la SP, disminuye el número de células secretoras de anticuerpos²⁴⁹.

Existen varios estudios acerca del efecto de los antagonistas del NK1R sobre la respuesta inmune innata y adaptativa, incluyendo la modulación de la producción de citoquinas, la proliferación inmune celular y la migración celular inmune. El tratamiento con **spantide** en ratones B6 con infección corneal por *Pseudomona Aeuriginosa* disminuyó significativamente el número de córneas perforadas, recuentos bacterianos y PMN. Los niveles de ARNm para las citoquinas tipo I (por ejemplo, IFN γ), así como MIP-2, IL-6, TNF α e IL-1 β (ARNm y proteína) también se redujeron significativamente después del tratamiento con spantide. La citoquina tipo II IL-10 (ARNm y proteína) estaba elevada, mientras que los niveles de ARNm de TGF β no cambiaron después del tratamiento con spantide²⁵⁰. El spantide suprime la producción de IL-2 por parte de las células T humanas y murinas, suprimiendo así la proliferación de las células T²⁵¹. El spantide también suprime la secreción de inmunoglobulinas de las células B en ratas²⁴⁹. El spantide antagoniza el rol de la SP en el reclutamiento de las células inmunes. Otros antagonistas de NK1R también tienen las mismas funciones. El **lanepitant**, por ejemplo, suprime la infiltración de leucocitos, la linfangiogénesis y hemangiogénesis en la córnea²⁵².

También se ha comprobado que la SP mejora la actividad *natural killer* de los linfocitos T²⁵³. Recientemente se ha demostrado que la interacción SP-NK1R promueve la generación de células de memoria Th17 humanas, en presencia de monocitos, para amplificar la respuesta inflamatoria²⁵⁴.

En la infección parasitaria por esquistosomiasis murina, se observa que los eosinófilos de los granulomas producen SP y las células T CD4 aisladas de los granulomas expresan

NK1R, lo que sugiere que la interacción SP-NK1R puede implicar a las células T CD4 en los granulomas²⁵⁵. De hecho, se ha documentado que la SP mejora la producción de IFN γ inducida por el antígeno de huevo de esquistosoma en las células T que expresan NK1R en ratones infectados con esquistosoma²⁵⁶.

CÉLULAS EPITELIALES

Se ha publicado la presencia de SP y NK1R en células epiteliales de las vías respiratorias, donde se sobreexpresan en sujetos asmáticos²⁵⁷. La SP estimula el crecimiento de las células epiteliales²⁵⁸ y potencia la producción de TGF β 1 (factor de crecimiento transformante β 1)²⁵⁹.

En la enfermedad inflamatoria intestinal, la SP se libera en el intestino, y se une al NK1R en las células epiteliales del colon, que activan tanto las vías proinflamatorias como las de reparación y proliferación tisular. La SP puede inducir la síntesis de citoquinas por las células epiteliales, tales como la IL-8 que atraen neutrófilos y causan infiltración^{260,261,262,263,264}. La liberación de estas citoquinas y quimioquinas por parte de células epiteliales e inmunes, modulan la diarrea, la inflamación y la motilidad asociada con la fisiopatología de varios estados de enfermedad intestinal²⁶⁵.

La SP y el NK1R se expresan en el epitelio corneal²⁶⁶. La SP vía NK1R mejora la síntesis de IL-8 en las células epiteliales corneales humanas²⁶⁷ y en los queratocitos, mejorando la migración celular²⁶⁸, promoviendo la cicatrización de la herida²⁶⁹. Se sabe que la SP actúa sinérgicamente con el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) para promover la migración de las células epiteliales de la córnea²⁷⁰. El tratamiento con SP/IGF-1 mejora la función de barrera y mejora la cicatrización de las heridas epiteliales en modelos animales de queratopatía neurotrófica^{271,272}.

Diferentes estudios sugieren un importante papel del sistema SP/NK1R en el mantenimiento de la homeostasis del epitelio corneal en estado de equilibrio^{273,274,275,276,277}.

MONOCITOS-MACRÓFAGOS

Sabemos que los monocitos/macrófagos en humanos y roedores expresan SP y su receptor NK1R^{100,278,279}. La SP estimula la secreción de citoquinas tales como IL-1, IL-6 y TNF α en los monocitos y macrófagos^{280,234,241}. También estimula la síntesis y liberación de

metabolitos del ácido araquidónico, la prostaglandina E₂, el tromboxano B₂ y los radicales de oxígeno tóxicos en macrófagos²⁸¹. Como ya se ha comentado, la SP regula positivamente la expresión de MIP-1 β , que promueve la migración de linfocitos y monocitos al sitio de la inflamación²⁴⁶.

La SP mejora la fagocitosis en macrófagos peritoneales murinos a través de su extremo N-terminal²⁸². Chernova et al.²⁸³ informaron que los monocitos de sangre periférica humana expresan el NK1R-T, pero no el NK1R-F; sin embargo, las interacciones de SP con NK1R-T no conducen a la movilización de calcio (Ca²⁺). Cuando el NK1R-F es transfectado en los monocitos, la SP puede movilizar el Ca²⁺. Además, a través del NK1R-T, la SP puede mejorar la movilización de Ca²⁺ inducida por la quimioquina CCL5, lo que conduce a la quimiotaxis, indicando que incluso la NK1R-T puede ser funcional en monocitos. Tanto el NK1R-T como el NK1R-F son funcionalmente activos en las células inmunes innatas y sus funciones parecen depender del tipo de célula^{283,284}. En los fagocitos mononucleares humanos, el tratamiento de un antagonista del NK1R regula negativamente la expresión del ARNm de la SP²⁸⁵.

La expresión de los NK1R aumenta notablemente durante la infección, especialmente en los linfocitos y macrófagos. En la infección por el VIH, la activación del NK1R por la SP contribuye al aumento de la infección por VIH en macrófagos²⁸⁶. Se han hallado altos niveles de SP en plasma de niños con VIH respecto a niños sin VIH²⁸⁷. Además, el uso de **aprepitant**, antagonista del NK1R, inhibe la infección por VIH y puede mejorar la actividad anti-VIH de ciertos antiretrovirales²⁸⁸. En un ensayo clínico realizado por Pablo Tebas, Steven D. Douglas y colegas²⁸⁹, en pacientes infectados por el VIH, el aprepitant, a dosis de 375 mg/día, no mostró actividad antiviral significativa, aunque los pacientes tratados con aprepitant mostraron una disminución en el número de células T CD4+ PD1+, las llamadas células T “agotadas”, y niveles plasmáticos disminuidos de SP y CD163 soluble (un marcador específico de activación de los macrófagos), lo que sugiere que el bloqueo de la vía NK1R desempeña un papel en la regulación de la activación de monocitos en la infección por VIH^{289,290,291}. El aprepitant actúa de manera dosis dependiente, a mayor dosis mayor efecto terapéutico. Por tanto, si se hubiera aumentado la dosis probablemente podría haber demostrado además una actividad contra el VIH en los pacientes.

CÉLULAS DENDRÍTICAS (CD)

Las CD son células presentadoras de antígenos y desempeñan un papel importante en la generación de una respuesta adaptativa de las células T a los antígenos externos. La SP y su receptor NK1R están presentes en células dendríticas humanas y de ratón^{169,292}. Su activación compromete la vía NF-κB y regula la función de los linfocitos T.

La SP regula la movilización de las CD hacia los ganglios linfáticos modulando la expresión de receptores de quimioquinas y moléculas de adhesión^{293,294,295}. Las CD derivadas de la médula ósea estimuladas con un agonista de NK1R producen IL-12, e inducen inmunidad de tipo I²⁹⁴. De manera similar, se ha demostrado que la administración in vivo del agonista de NK1R potencia las funciones inmunoestimuladoras de las células de Langerhans residentes en la piel para inducir una inmunidad de tipo I específica de antígeno en un modelo de ratón²⁹⁵.

También se ha demostrado que la SP mejora la supervivencia de las CD²⁹⁶, lo que sugiere un posible papel in vivo de la SP en el mantenimiento de poblaciones de CD en condiciones homeostáticas, especialmente en tejidos altamente inervados con nervios sensoriales como la piel y la córnea.

En el pulmón la SP responde a antígenos inhalados promoviendo el reclutamiento de las CD²⁹⁷.

En resumen, la SP modula la activación de varias células inmunes innatas (por ejemplo, fagocitosis y secreción de citoquinas) y promueve la supervivencia de células inmunes innatas como las células NK, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, mastocitos y eosinófilos²⁹⁸.

Basándonos en estas publicaciones, la SP regularía las células que encontramos en las amígdalas de nuestro estudio. Por un lado, la SP activa los linfocitos amigdalares, aumenta su proliferación y mejora la secreción de inmunoglobulinas y citoquinas proinflamatorias. Por otro lado, la SP estimula el crecimiento de las células epiteliales de la amígdala, induce la síntesis de citoquinas, mejorando la migración celular. Por último, la SP potencia las funciones inmunoestimuladoras de las CD para inducir inmunidad de tipo I. Los antagonistas del NK1R contrarrestan el papel de la SP sobre las células amigdalares.

En nuestro estudio, la expresión celular de SP/NK1R en amígdalas con amigdalitis de repetición es relativamente escasa, lo que coincide con los estudios de Goldbart²⁰⁸ y Gozal²⁰⁹. Si hubiésemos determinado la expresión de SP y NK1R en amígdalas sanas probablemente sería muy inferior respecto a las amígdalas de nuestro estudio.

Puesto que hemos encontrado niveles bajos de SP/NK1R en las amigdalitis de repetición, hay menor proliferación celular y menor liberación de citoquinas inflamatorias, por lo que la respuesta inmune es menor ante la infección, por eso hay más infecciones amigdalares. El uso de antagonistas de NK1R, al actuar de manera concentración dependiente, inhibiría la liberación de citoquinas, pero no disminuiría la proliferación celular, pues es necesario mayor concentración de NK1R para producir este efecto.

El diseño morfológico descriptivo de este estudio lleva implícito una serie de limitaciones que pueden haber tenido alguna influencia en los resultados obtenidos. Se diseñó un sistema ciego a la hora de interpretar los resultados, se empleó una escala semicuantitativa en la valoración de la extensión e intensidad de la tinción, todo ello con el fin de objetivar los resultados en la medida de lo posible. A pesar de ello, la falta de estandarización en la valoración hace que haya podido haber algún sesgo por la subjetividad del observador en la interpretación de los resultados. No obstante, consideramos que la elevada reproductibilidad y alto grado de coincidencia de los resultados hallados entre los diferentes casos estudiados sugiere que dichas limitaciones deben haber tenido un impacto limitado en las conclusiones finales de este trabajo.

VI. CONCLUSIONES

1. Se describe por primera vez la inmunolocalización de la SP y el NK1R en las células de las amígdalas palatinas con amigdalitis recurrentes.
2. La SP sigue un patrón de expresión y distribución inmunohistoquímica en tejido amigdalar predominantemente nuclear.
3. El NK1R sigue un patrón de expresión y distribución inmunohistoquímica en tejido amigdalar predominantemente citoplasmático.
4. La presencia de SP y NK1R en las células de las amígdalas palatinas con amigdalitis recurrentes implica que estarían regulando la inflamación neurogénica a dicho nivel y, a su vez, están regulando la liberación de citoquinas por estas células inflamatorias.
5. La inmunorreactividad de la SP y el NK1R en las células de las amígdalas con amigdalitis recurrentes establece las bases para una mejor comprensión de las infecciones amigdalares recurrentes.
6. La presencia de SP y NK1R en las células de las amígdalas palatinas con amigdalitis recurrentes abre la puerta a un posible uso de los antagonistas de los NK1R en esta patología infecciosa.

VII. ANEXO

DICTAMEN ÚNICO EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ANDALUCÍA

D/Dª. Jose Salas Turrents como secretario/a del CEI de los hospitales universitarios Virgen Macarena-Virgen del Rocío

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta de (No hay promotor/a asociado/a) para realizar el estudio de investigación titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: **Inmunolocalización de la Sustancia P y el receptor Neuroquinina 1 en amígdalas palatinas con amigdalitis recurrentes („ Sustancia P y NK1R en amigdalitis recurrentes)**

Protocolo, Versión:

HIP, Versión:

CI, Versión:

Y que considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se ajusta a los principios éticos aplicables a este tipo de estudios.

La capacidad del/de la investigador/a y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Están justificados los riesgos y molestias previsibles para los participantes.

Que los aspectos económicos involucrados en el proyecto, no interfieren con respecto a los postulados éticos.

Y que este Comité considera, que dicho estudio puede ser realizado en los Centros de la Comunidad Autónoma de Andalucía que se relacionan, para lo cual corresponde a la Dirección del Centro correspondiente determinar si la capacidad y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Lo que firmo en SEVILLA a 20/01/2017

D/Dª. Jose Salas Turrents, como Secretario/a del CEI de los hospitales universitarios Virgen Macarena-Virgen del Rocío



Código Seguro De Verificación:	89c2eba48c625b413e51083b6c2f711af12d5049	Fecha:	20/01/2017		
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.				
Firmado Por	Jose Salas Turrents				
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldetetica/shtml/ayuda/verifica?PirmaDocumento.iface/cods/89c2eba48c625b413e51083b6c2f711af12d5049	Página	1/2		

CERTIFICA

Que este Comité ha ponderado y evaluado en sesión celebrada el 22/12/2016 y recogida en acta 14/2016 la propuesta del/la Promotor/a (No hay promotor/a asociado/a), para realizar el estudio de investigación titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: Inmunolocalización de la Sustancia P y el receptor Neuroquinina 1 en amígdalas palatinas con amigdalitis recurrentes. (Sustancia P y NK1R en amigdalitis recurrentes)

Protocolo, Versión:

HIP, Versión:

CI, Versión:

Que a dicha sesión asistieron los siguientes integrantes del Comité:

President/a

D/Dª. Víctor Sánchez Margalet

Vicepresident/a

D/Dª. Dolores Jiménez Hernández

Secretario/a

D/Dª. Jose Salas Turrents

Vocales

D/Dª. Enrique Calderón Sandubete

D/Dª. Francisco Javier Bautista Paloma

D/Dª. Gabriel Ramírez Solo

D/Dª. Carlos García Pérez

D/Dª. Joaquín Guiraitte Enriquez

D/Dª. Cristina Pichardo Guerrero

D/Dª. Javier Vitorica Fernandez

D/Dª. Juan Carlos Gomez Rosado

D/Dª. CRISTOBAL MORALES PORTILLO

D/Dª. Elisa Torres Bufon

D/Dª. Luis Lopez Rodriguez

D/Dª. Enrique de Álava Casado

D/Dª. EVA MARIA DELGADO CUESTA

D/Dª. M LORENA LOPEZ CERERO

D/Dª. Amancio Carnero Moya

D/Dª. Manuel Ortega Calvo

D/Dª. LUIS GABRIEL LUQUE ROMERO

D/Dª. ANTONIO PÉREZ PÉREZ

D/Dª. María Pilar Guadix

Que dicho Comité, está constituido y actúa de acuerdo con la normativa vigente y las directrices de la Conferencia Internacional de Buena Práctica Clínica.



Lo que firmo en SEVILLA a 20/01/2017

Código Seguro De Verificación:	89c2eba48c625b413e53093b0c2f731ef32d5049	Fecha:	20/01/2017		
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.				
Firmado Por	Jose Salas Turrents				
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldesitica/shtml/ayuda/verifica?PirmaDocumento.ifface/code/89c2eba48c625b413e53093b0c2f731ef32d5049	Página	2/2		

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Sadler TW. Embriología médica Langman. 7ª ed. México: Ed. Panamericana;1996.
2. Molina B, Montes de Oca L, Gamboa FJ. Embriología y anatomía de la cavidad oral y faringe. Cap. 67, Libro virtual de formación en Otorrinolaringología. Disponible en:
<http://seorl.net/PDF/Cavidad%20oral%20faringe%20esofago/067%20-%20EMBRIOLOG%C3%8DA%20Y%20ANATOM%C3%8DA%20DE%20LA%20CAVIDAD%20ORAL%20Y%20FARINGE.pdf>
3. Netter FH. Atlas de Anatomía Humana. USA: Ciba-Geigy Corporation. 1996.
4. Dehesdin D, Choussy O. Anatomie du pharynx. Encycl Méd Quir (Editions scientifiques et médicales, Elsevier SAS, Paris), Oto-rhino-laryngologie, 20-491-A-10, 1998, 10p.
5. Mingo EM, Chacón J, Padilla M. Fisiopatología del anillo de Waldeyer. Cap. 75, Libro virtual de formación en Otorrinolaringología. Disponible en:
<http://seorl.net/PDF/Cavidad%20oral%20faringe%20esofago/075%20-%20FISIOPATOLOG%C3%8DA%20DEL%20ANILLO%20WALDEYER.pdf>
6. Welsch U. Sobotta Histología. 2ª ed. España: Ed. Panamericana;2010.
7. Suárez C, Gil-Garcedo LM, Marco J, Medina JE, Ortega P, Trinidad J. Tratado de Otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello. 2ª ed. España: Ed. Panamericana; 2008. Tomo III, Enfermedades no oncológicas de la cavidad oral, glándulas salivales, faringe y laringe. Cirugía plástica y reconstructiva facial. Traumatología facial. Cap. 159, Anatomía de la faringe; 2349-2368.
8. Fioretti A. Die Gauminmandel. Direction Stuttgart editors. Georg Thime, 1961.
9. Ross M, Pawlina W. Histología. Texto y Atlas color con biología celular y molecular. 5ª ed. Buenos Aires: Ed. Panamericana;2007.
10. Cots JM, Alós JI, Bárcena M, Boleda X, Cañada JL, Gómez N, et al. Documento de consenso: Recomendaciones para el manejo de la faringoamigdalitis aguda del adulto. Aten Primaria. 2015;47(8):532-543.
11. Chacón J, Morales JM, Padilla M. Patología inflamatoria inespecífica de la faringe. Cap. 76, Libro virtual de formación en Otorrinolaringología. Disponible en:
<http://seorl.net/PDF/Cavidad%20oral%20faringe%20esofago/076%20-%20PATOLOG%C3%8DA%20INFLAMATORIA%20INESPEC%C3%8DFICA%20DE%20LA%20FARINGE.pdf>
12. Bird JH, Biggs TC, King EV. Controversies in the management of acute tonsillitis: an evidence-based review. Clin. Otolaryngol. 2014;39(6):368-374.
13. Bisno AL. Acute pharyngitis: Etiology and diagnosis. Pediatrics.1996; 97:949-54.

14. Ebell MH, Smith MA, Barry HC, Ives K, Carey M. The rational clinical examination. Does this patient have strep throat? *JAMA*. 2000;284:2912–2918.
15. Wessels MR. Clinical practice. Streptococcal pharyngitis. *N Engl J Med*. 2011;364:648-55.
16. Pelucchi C, Grigoryan L, Galeone C, Esposito S, Huovinen P, Little P, et al., ESCMID Sore Throat Guideline Group. Guideline for the management of acute sore throat. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18 Suppl 1:1-28.
17. Gleeson MJ, Browning G, Burton MJ, et al. *Scott-Brown's Otorhinolaryngology: Head and Neck Surgery*. 7th ed. London: Hodder Arnold;2008.
18. Piñeiro R, Hijano F, Álvez F, Fernández A, Silva JC, Pérez C, et al. Documento de consenso sobre el diagnóstico y tratamiento de la faringoamigdalitis aguda. *An Pediatr (Barc)*. 2011;75(5):342.e1-342.e13.
19. Centor RM, Witherspoon JM, Dalton HP, Brody CE, Link K. The diagnosis of strep throat in adults in the emergency room. *Med Decis Making*. 1981;1:239-46.
20. McIsaac WJ, Kellner JD, Aufricht P, Vanjaka A, Low DE. Empirical validation of guidelines for the management of pharyngitis in children adults. *JAMA*. 2004;291:1587-95 [Erratum, *JAMA* 2005;294:2700].
21. *Respiratory Tract Infections - Antibiotic Prescribing: Prescribing of Antibiotics for Self-Limiting Respiratory Tract Infections in Adults and Children in Primary Care*. National Institute for Health and Clinical Excellence, n. 69: Guidance London;2008.
22. Little P, Stuart B, Hobbs FD, Butler CC, Hay AD, Delaney B, et al.; DESCARTE investigators. Antibiotic prescription strategies for acute sore throat: A prospective observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2014;14:213-9.
23. Caplan C. Case against the use of throat culture in the management of streptococcal pharyngitis. *J Fam Pract*. 1979;8:485–490.
24. Van Driel ML, De Sutter AI, Keber N. et al. Different antibiotic treatments for group A streptococcal pharyngitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;30, CD004406.
25. Shulman ST, Bisno AL, Clegg HW, Gerber MA, Kaplan EL, Lee G, et al. *Infectious Clinical Practice Guideline for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: 2012 update by the Infectious Diseases Society of America*. *Clin Infect Dis*. 2012 Nov 15;55(10):e86-102.

26. University of Michigan Health System. Pharyngitis guideline. [Internet]. Ann Arbor: University of Michigan Health System; 2013. Disponible en: <http://www.med.umich.edu/1info/FHP/practiceguides/pharyngitis/pharyn.pdf>
27. Fernández R, Serrano C, Corral S, et al. Guía de Terapéutica Antimicrobiana del Área Aljarafe. 2ª edición. Sevilla: Distrito Sanitario Aljarafe, Servicio Andaluz de Salud, Consejería de Salud; 2012.
28. Vallés H, et al. Otorrinolaringología. 1ª ed. España: Prensas de la Universidad de Zaragoza; 2016.
29. Maltrana-García JA, El Uali-Abeida M, Pérez-Delgado L, Adiego-Lieza I, Vicente-González EA, Ortiz-García A. Síndrome de apnea obstructiva en niños. Acta otorrinolaringol Esp. 2009;60(3):202-7.
30. American Thoracic Society. Standards and indications for cardiopulmonary sleep studies in children. Am J Respir Crit Care Med. 1996;153:866–878.
31. Clinical Practice Guideline: Diagnosis and Management of Childhood Obstructive Sleep Apnea Syndrome. Pediatrics. 2002;109:704-712.
32. Villa JR, Martínez C, Pérez G, Cortell I, Gómez-Pastrana D, Álvarez D, González E. Guía de diagnóstico y tratamiento del síndrome de apneas-hipopneas del sueño en el niño. An Pediatr (Barc). 2006;65(4):364-76.
33. Ali NJ, Pitson DJ, Stradling JR. Snoring, sleep disturbance and behaviour in 4-5 year olds. Arch Dis Child. 1993;68:360-366.
34. Gislason T, Benediktsdottir B. Snoring, apneic episodes, and nocturnal hypoxemia among children 6 months to 6 years old. An epidemiologic study of lower limit of prevalence. Chest. 1995;107:963-966.
35. Nixon GM, Kermack AS, Davis GM, Manoukian JJ. Planning adenotonsillectomy in children with obstructive sleep apnea: The role of overnight oximetry. Pediatrics. 2004;113:19-25.
36. Venekamp RP, Hearne BJ, Chandrasekharan D, Blackshaw H, Lim J, Schilder AG. Tonsillectomy or adenotonsillectomy versus non-surgical management for obstructive sleep-disordered breathing in children. Cochrane Database Syst Rev. 2015 Oct 14;(10):CD011165.
37. Darrow DH, Siemens C. Indications for tonsillectomy and adenoidectomy. Laryngoscope. 2002;112 Suppl 100:6-10.

38. Villa JR, De Miguel J, Vecchi A, Romero F, Muñoz-Codoceo R, Bartolome M, et al. Evaluación clínica y polisomnográfica de niños con SAOS antes y después de la adenoamigdalectomía. *Acta Pediatr Esp.* 2000;58:16-22.
39. Suen JS, Arnold JE, Brooks LJ. Adenotonsillectomy for treatment of obstructive sleep apnea in children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995;121:525-30.
40. Guillemainault C, Lee JH, Chan A. Pediatric obstructive sleep apnea syndrome. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2005;159:775-85.
41. Brouillette RT, Manoukian JJ, Ducharme FM, Oudjhane K, Earle LG, Ladan S. Efficacy of fluticasone nasal spray for pediatric obstructive sleep apnea. *J Pediatr.* 2001;138:838-44.
42. Goldbart AD, Golman JL, Veling MC, Gozal D. Leukotriene modifier therapy for mild sleep-disordered breathing in children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:364-70.
43. Kheirandish L, Goldbart AD, Gozal D. Intranasal steroids and oral leukotriene modifier therapy in residual sleep-disordered breathing after tonsillectomy and adenoidectomy in children. *Pediatrics.* 2006;117:61-6.
44. Macaya A, Arruti I, Quer S. Amigdalectomía y adenoidectomía. Indicaciones, técnicas y complicaciones. Cap. 79, Libro virtual de formación en Otorrinolaringología. Disponible en:
<http://seorl.net/PDF/Cavidad%20oral%20faringe%20esofago/079%20-%20AMIGDALECTOM%C3%8DA%20Y%20ADENOIDECTOM%C3%8DA%20INDICACIONES,%20T%C3%89CNICAS%20Y%20COMPLICACIONES.pdf>
45. Glover JA. The incidence of tonsillectomy in school children. *Proc R Soc Med.* 1938;31:1219-36.
46. Paradise JL, Bluestone CD, Bachman RZ, Colborn DK, Bernard BS, Taylor FH, et al. Efficacy of tonsillectomy for recurrent throat infection in severely affected children. Results of parallel randomized and nonrandomized clinical trials. *N Engl J Med.* 1984 Mar 15;310(11):674-83.
47. Paradise JL, Bluestone CD, Colborn DK, Bernard BS, Rockette HE, Kurs-Lasky M. Tonsillectomy and adenotonsillectomy for recurrent throat infection in moderately affected children. *Pediatrics.* 2002 Jul;110(1 Pt 1):7-15.
48. Van Staaik BK, van den Akker EH, Rovers MM, Hordijk GJ, Hoes AW, Schilder AG. Effectiveness of adenotonsillectomy in children with mild symptoms of throat

- infections or adenotonsillar hypertrophy: open, randomised controlled trial. *BMJ*. 2004;329(7467):651-6.
49. Barraclough J, Anari S. Tonsillectomy for recurrent sore throats in children: indications, outcomes, and efficacy. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014 May;150(5):722-9.
 50. Baugh RF et al. Clinical practice guideline: tonsillectomy in children. *Otolaryngology Head and Neck*. 2011;144(1S) S1-S30.
 51. Lescanne E et al. Pediatric tonsillectomy: clinical practice guidelines. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck diseases*. 2012;129:264-271.
 52. Cervera J, Del Castillo F, Gómez JA, Gras JR, Pérez B, Villafruela MA. Indicaciones de amigdalectomía y adenoidectomía: Documento de consenso entre la Sociedad Española de Otorrinolaringología y Patología Cérvicofacial y la Asociación Española de Pediatría. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2006;57:59-65.
 53. Windfuhr JP. Indications for tonsillectomy stratified by the level of evidence. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2016;15:Doc09.
 54. Wang H, Fu Y, Feng Y, Guan J, Yin S. Tonsillectomy versus tonsillotomy for sleep-disordered breathing in children: a meta analysis. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0121500.
 55. Proceso Asistencial Integrado: Amigdalectomía-Adenoidectomía. Consejería de Salud, Junta de Andalucía; 2003.
 56. Hökfelt T, Mutt V. Neuropeptides. *The encyclopedia of Neuroscience*. Boston, BirKhäuser: ed. G. Adelman; 1987. 1-8p.
 57. Blázquez E, Álvarez E, Navarro M, Roncero I, Rodríguez-Fonseca F, Chowen JA, et al. Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide as a novel neuropeptide. *Mol Neurobiol* 1998;18:157-73.
 58. García-López MJ, Martínez-Martos JM, Mayas MD, Carrera MP, Ramírez-Expósito MJ. Fisiología de los neuropéptidos. *Rev Neurol*. 2002;35(8):784-793.
 59. Von Euler US, Gaddum JH. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol*. 1931;72(1):74-87.
 60. Chang MM, Leeman SE. Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. *Journal of Biological Chemistry*. 1970;245(18):4784-4790.
 61. Chang MM, Leeman SE, Niall HD. Amino-acid sequence of substance P. *Nature*. 1971;232(29):86-87.

62. Kimura S, Okada M, Sugita Y, Kanazawa I, Munekata E. Novel neuropeptides, neurokinin α and β , isolated from porcine spinal cord. *Proc Japan Acad Ser B*. 1983;59(4):101–104.
63. Nawa H, Hirose T, Takashima H, Inayama S, Nakanishi S. Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine brain substance P precursor. *Nature*. 1983;306(5938):32-36.
64. Kangawa K, Minamino N, Fukuda A, Matsuo H. Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983;114(2):533-540.
65. Tatemoto K, Lundberg JM, Jörnvall H, Mutt V. Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985;128(2):947-953.
66. Kage RR, McGregor GP, Thim LL, Conlon JM. Neuropeptide-gamma: a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from gamma-preprotachykinin. *J Neurochem*. 1988;50(5):1412-1417.
67. Zhang Y, Lu L, Furlonger C, Wu GE, Paige CJ. Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nat Immunol*. 2000;1(5):392-397.
68. Page NM, Bell NJ, Gardiner SM, Manyonda IT, Brayley KJ, Strange PG, Lowry PJ. Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(10):6245-6250.
69. Erspamer V. [Título no disponible]. *Farmacol*. 1949;4(2):179-181.
70. Schoofs L, Holman GM, Hayes TK, Nachman RJ, De Loof A. Locustatachykinin I and II, two novel insect neuropeptides with homology to peptides of the vertebrate tachykinin family. *FEBS Lett*. 1990;261(2):397-401.
71. Champagne DE, Ribeiro JM. Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci*. 1994;91(1):138-142.
72. Almeida TA, Rojo J, Nieto PM, Pinto FM, Hernández M, Martín JD, Candenas ML. Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr Med Chem*. 2004;11(15):2045-2081.
73. Cascieri MA, Huang RR, Fong TM, Cheung AH, Sadowski S, Ber E, Strader CD. Determination of the amino acid residues in substance P conferring selectivity and specificity for the rat neurokinin receptors. *Mol Pharmacol* 1992;41(6):1096-1099.

74. Maggi CA. The mammalian tachykinin receptors. *Gen Pharmacol.* 1995;26(5):911-944.
75. Ingi T, Kitajima Y, Minamitake Y, Nakanishi S. Characterization of ligand-binding properties and selectivities of three rat tachykinin receptors by transfection and functional expression of their cloned cDNAs in mammalian cells. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;259(3):968-975.
76. Steinhoff MS, von Mentzer B, Geppetti P, Pothoulakis C, Bunnett NW. Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. *Physiological reviews.* 2014;94(1):265-301.
77. Pennefather JN, Lecci A, Candenas ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci.* 2004;74:1445-63.
78. Page NM. New challenges in the study of the mammalian tachykinins. *Peptides.* 2005;26(8):1356-1368.
79. Harmar AJ, Hyde V, Chapman K. Identification and cDNA sequence of delta-preprotachykinin, a fourth splicing variant of the rat substance P precursor. *FEBS Lett.* 1990;275(1-2):22-24.
80. Kawaguchi Y, Hoshimaru M, Nawa H, Nakanishi S. Sequence analysis of cloned cDNA for rat substance P precursor: existence of a third substance P precursor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986;139(3):1040-1046.
81. Nawa H, Kotani H, Nakanishi S. Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing. *Nature.* 1984;312(5996):729-734.
82. Pinto FM, Almeida TA, Hernández M, Devillier P, Advenier C, Candenas ML. mRNA expression of tachykinins and tachykinin receptors in different human tissues. *Eur J Pharmacol.* 2004;494(2-3):233-239.
83. Marzioni D, Fiore G, Giordano A, Nabissi M, Florio P, Verdenelli F, Castellucci M. Placental expression of substance P and vasoactive intestinal peptide: evidence for a local effect on hormone release. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(4):2378-2383.
84. Kotani H, Hoshimaru M, Nawa H, Nakanishi S. Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83(18):7074-78.
85. Hökfelt T, Pernow B, Wahren J. Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *J Intern Med.* 2001;249(1):27-40.

86. Kurtz MM, Wang R, Clements MK, Cascieri MA, Austin CP, Cunningham BR, Liu Q. Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P-like peptides. *Gene*. 2002;296(1-2):205-212.
87. Page NM. Hemokinins and endokinins. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2004;61(13):1652-1663.
88. Krause WJ, Cullingford GL, Freeman RH, Eber SL, Richardson KC, Fok KF, Forte LR. Distribution of heat-stable enterotoxin/guanylin receptors in the intestinal tract of man and other mammals. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Anat*. 1994;184 (Pt 2):407-417.
89. Regoli D, Boudon A, Fauchere JL. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev*. 1994;46(4):551-599.
90. Masu Y, Nakayama K, Tamaki H, Harada Y, Kuno M, Nakanishi S. cDNA cloning of bovine substance-K receptor through oocyte expression system. *Nature*. 1987;329(6142):836-838.
91. Nakanishi S. Mammalian tachykinin receptors. *Annu Rev Neurosci*. 1991;14:123-136.
92. Ohkubo H, Nakanishi S. Molecular characterization of the three tachykinin receptors. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;632:53-62.
93. Sarau HM, Mooney JL, Schmidt DB, Foley JJ, Buckley PT, Giardina GA, Wang DY, Lee JA, Hay DW. Evidence that the proposed novel human "neurokinin-4" receptor is pharmacologically similar to the human neurokinin-3 receptor but is not of human origin. *Mol Pharmacol*. 2000 Sep;58(3):552-9.
94. Burcher E, Alouan LA, Johnson PR, Black JL. Neuropeptide gamma, the most potent contractile tachykinin in human isolated bronchus, acts via a 'nonclassical' NK2 receptor. *Neuropeptides*. 1991;20(2):79-82.
95. Van Giersbergen PL, Shatzer SA, Burcher E, Buck SH. Comparison of the effects of neuropeptide K and neuropeptide gamma with neurokinin A at NK2 receptors in the hamster urinary bladder. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1992;345(1):51-56.
96. Morteau O, Lu B, Gerard C, Gerard NP. Hemokinin 1 is a full agonist at the substance P receptor. *Nat Immunol*. 2001;2(12):1088.
97. Klassert TE, Patel SA, Rameshwar P. Tachykinins and Neurokinin Receptors in Bone Marrow Functions: Neural-Hematopoietic Link. *J. Receptor Ligand Channel Res*. 2010;2010(3):51-61.

98. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. Sixth ed. USA: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2015.
99. Blanco Martínez B. *La SP y el RNK1 en la esclerosis mesial temporal*. [Tesis doctoral]. Sevilla: Universidad de Sevilla; 2012.
100. Ho WZ, Lai JP, Zhu XH, Uvaydova M, Douglas SD. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J Immunol*. 1997;159(11):5654-5660.
101. Lai JP, Douglas SD, Ho WZ. Human lymphocytes express substance P and its receptor. *J Neuroimmunol*. 1998;86(1):80-86.
102. Patacchini R, Maggi CA. Peripheral tachykinin receptors as targets for new drugs. *Eur J Pharmacol*. 2001;429(1-3):13-21.
103. Stewart-Lee A, Burnstock G. Actions of tachykinins on the rabbit mesenteric artery: substance P and [Glp6,L-Pro9]SP6-11 are potent agonists for endothelial neurokinin-1 receptors. *Br J Pharmacol*. 1989;97(4):1218-1224.
104. Tsuchida K, Shigemoto R, Yokota Y, Nakanishi S. Tissue distribution and quantitation of the mRNAs for three rat tachykinin receptors. *Eur J Biochem*. 1990;193(3):751-757.
105. Pennefather JN, Zeng XP, Gould D, Hall S, Burcher E. Mammalian tachykinins stimulate rat uterus by activating NK-2 receptors. *Peptides*. 1993;14(2):169-174.
106. Saffroy M, Torrens Y, Glowinski J, Beaujouan JC. Presence of NK2 binding sites in the rat brain. *J Neurochem*. 2001;79(5):985-996.
107. Fioramonti J, Gaultier E, Toulouse M, Sanger GJ, Bueno L. Intestinal anti-nociceptive behaviour of NK3 receptor antagonism in conscious rats: evidence to support a peripheral mechanism of action. *Neurogastroenterol Motil*. 2003;15(4):363-369.
108. Lecci A, Maggi CA. Peripheral tachykinin receptors as potential therapeutic targets in visceral diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2003;7(3):343-362.
109. Minneman KP. Splice variants of G protein-coupled receptors. *Mol. Interv*. 2001;1(2):108-116.
110. Hershey AD, Dykema PE, Krause JE. Organization, structure, and expression of the gene encoding the rat substance P receptor. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Biol Chem*. 1991;266(7):4366-4374.

111. Tregear GW, Niall HD, Potts JT, Leeman SE, Chang MM. Synthesis of substance P. *Nature (New Biol)*. 1971;232:87-9.
112. Powell D, Leeman SE, Tregear GW, Niall HD, Potts JT. Radioimmunoassay for substance P. *Nature (New Biol)*. 1973;241:252-4.
113. Pernow B. Substance P. *Pharmacol Rev*. 1983;35(2):85-141.
114. Lembeck F. Central transmission of afferent impulses. III. Incidence and significance of the substance P in the dorsal roots of the spinal cord. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol*. 1953;219(3):197-213.
115. Benuck M, Marks N. Enzymatic inactivation of substance P by a partially purified enzyme from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1975;65(1):153-160.
116. Okamoto A, Lovett M, Payan DG, Bunnett NW. Interactions between neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) and the substance P (NK1) receptor expressed in mammalian cells. *Biochem J*. 1994;299(Pt 3):683-693.
117. Eberlin M, Muck T, Michel MC. A comprehensive review of the pharmacodynamics, pharmacokinetics, and clinical effects of the neutral endopeptidase inhibitor racecadotril. *Front Pharmacol*. 2012;3:93.
118. Offermanns S, Rosenthal W. *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. 2nd ed. Germany: Springer; 2008.
119. Painter RG, Dukes R, Sullivan J, Carter R, Erdos EG, Johnson AR. Function of neutral endopeptidase on the cell membrane of human neutrophils. *J Biol Chem*. 1988;263(19):9456-9461.
120. Severini C, Improta G, Falconieri-Erspamer G, Salvadori S, Erspamer V. The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev*. 2002;54(2):285-322.
121. Graham GJ, Stevens JM, Page NM, Grant AD, Brain SD, Lowry PJ, Gibbins JM. Tachykinins regulate the function of platelets. *Blood*. 2004;104(4):1058-1065.
122. Nilsson J, Von Euler AM, Dalsgaard CJ. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature*. 1985;315:61-63.
123. Perrone MH, Lepore RD, Shain W. Identification and characterization of substance P receptors on LRM55 glial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 1986;238(2):389-395.
124. Beaujouan JC, Torrens Y, Saffroy M, Kemel ML, Glowinski J. A 25 year adventure in the field of tachykinins. *Peptides*. 2004;25(3):339-357.
125. Shimizu Y, Matsuyama H, Shiina T, Takewaki T, Furness JB. Tachykinins and their functions in the gastrointestinal tract. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(2):295-311.

126. Muñoz M, Carranza A, Pavón A, Anderson G, Coveñas R. Immunolocalization of substance P and NK-1 receptor in Hofbauer cells in human normal placenta. *Microsc Res Tech.* 2013 Dec;76(12):1310-3.
127. Muñoz M, Coveñas R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in cancer. *Peptides.* 2013a;48:1–9.
128. Hastrup H, Schwartz TW. Septide and neurokinin A are high-affinity ligands on the NK-1 receptor: evidence from homologous versus heterologous binding analysis. *FEBS Lett.* 1996;399(3):264-266.
129. Villar AV, Goni FM, Alonso A, Jones DR, Leon Y, Varela-Nieto I. Phospholipase cleavage of glycosylphosphatidylinositol reconstituted in liposomal membranes. *FEBS Lett.* 1998;432(3):150-154.
130. Lecat S, Bucher B, Mely Y, Galzi JL. Mutations in the extracellular amino-terminal domain of the NK2 neurokinin receptor abolish cAMP signaling but preserve intracellular calcium responses. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Biol Chem.* 2002;277(44):42034-42048.
131. Maggi CA, Schwartz TW. The dual nature of the tachykinin NK1 receptor. [Review]. *Trends Pharmacol Sci.* 1997;18(10):351-355.
132. Palanche T, Ilien B, Zoffmann S, Reck MP, Bucher B, Edelstein SJ, Galzi JL. The neurokinin A receptor activates calcium and cAMP responses through distinct conformational states. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Biol Chem.* 2001;276(37):34853-34861.
133. Rosso M, Muñoz M, Berger M. The role of neurokinin-1 receptor in the microenvironment of inflammation and cancer. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:381434.
134. Grady EF, Garland AM, Gamp PD, Lovett M, Payan DG, Bunnett NW. Delineation of the endocytic pathway of substance P and its seven-transmembrane domain NK1 receptor. *Mol Biol Cell.* 1995;6(5):509-524.
135. Kage R, Leeman SE, Boyd ND. Biochemical characterization of two different forms of the substance P receptor in rat submaxillary gland. *J Neurochem.* 1993 Jan;60(1):347-51
136. Lai JP, Lai S, Tuluc F, Tansky MF, Kilpatrick LE, Leeman SE, Douglas SD. Differences in the length of the carboxyl terminus mediate functional properties of neurokinin-1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008 Aug 26;105(34):12605-10.

137. Fong TM, Anderson SA, Yu H, Huang RR, Strader CD. Differential activation of intracellular effector by two isoforms of human neurokinin-1 receptor. *Mol Pharmacol.* 1992 Jan;41(1):24-30.
138. Cuello AC, Kanazawa I. The distribution of substance P immunoreactive fibres in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 1978;178:129-156.
139. Hökfelt T, Pernow B, Nilsson G, Wetterberg L, Goldstein M, Jeffcoate SL. Dense plexus of substance P-immunoreactive nerve terminals in eminentia medialis of the primate hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978;74:1013-1015.
140. Mai JK, Stephens PH, Hopf A, Cuello AC. Substance P in the human brain. *Neuroscience.* 1986;17:709-739.
141. Wolf SS, Moody TW, Quirion R, O'Donohue TL. Biochemical characterization and autoradiographic localization of central SP receptor using [¹²⁵I]physalaemin. *Brain Res.* 1985;332:299-307.
142. Saffroy M, Beaujouan JC, Torrens Y, Besseyre J, Bergstrom L, Glowinski J. Localization of tachykinin binding sites (NK1, NK2, NK3 ligands) in the rat brain. *Peptides.* 1988;9:227-241.
143. Maeno H, Kiyama H, Tohyama M. Distribution of the substance P (NK1) receptor in the central nervous system. *Mol Brain Res.* 1993;18:43-58.
144. Nakaya Y, Kaneko T, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N. Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol.* 1994;347:249-274.
145. Ebner K, Singewald N. The role of substance P in stress and anxiety responses. *Amino Acids.* 2006;31:251-272.
146. Ebner K, Sartori SB, Singewald N. Tachykinin receptors as therapeutic targets in stress-related disorders. *Curr Pharm Des.* 2009;15:1647-1674.
147. Muñoz M, Coveñas R. NK-1 receptor antagonists: a new paradigm in pharmacological therapy. *Curr Med Chem.* 2011;18:1820-1831.
148. Muñoz M, Coveñas R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in human pathology. *Amino Acids.* 2014;46(7):1727-1750.
149. Shimizu Y, Matsuyama H, Shiina T, Takewaki T, Furness JB. Tachykinins and their functions in the gastrointestinal tract. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65:295-311.
150. Nilsson G, Dahlberg K, Brodin E, Sundler F, Strandberg K. Distribution and constrictor effect of substance P in guinea pig tracheobronchial tissues. In: Euler US von, Pernow B (eds). *Substance P.* New York: Raven Press; 1977. 75-81p.

151. Chapman RW, Hey JA, McLeod R, Minnicozzi M, Rizzo C. Tachykinins in the lungs. *Drug News Perspect.* 1998;11(8):480-489.
152. Candenias L, Lecci A, Pinto FM, Patak E, Maggi CA, Pennefather JN. Tachykinins and tachykinin receptors: effects in the genitourinary tract. *Life Sci.* 2005;76:835-862.
153. Muñoz M, Pavón A, Rosso M, Salinas MV, Pérez A, Carranza A, González-Ortega A. Immunolocalization of NK-1 receptor and Substance P in human normal placenta. *Placenta.* 2010;31(7):649-651.
154. Arck PC, Merali FS, Stanisz AM, Stead RH, Chaouat G, Manuel J, Clark DA. Stress-induced murine abortion associated with substance P-dependent alteration in cytokines in maternal uterine decidua. *Biol Reprod.* 1995;53:814-819.
155. Page NM, Woods RJ, Gardiner SM, Lomthaisong K, Gladwell RT, Butlin DJ, Manyonda IT, Lowry PJ. Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia. *Nature.* 2000;405:797-800.
156. Page NM, Dakour J, Morrish DW. Gene regulation of neurokinin B and its receptor NK3 in late pregnancy and pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod.* 2006;12:427-433.
157. Dalsgaard CJ, Jonsson CE, Hijkfelt T, Cuello AC. Localization of substance P-immunoreactive nerve fibers in the human digital skin. *Experientia Basel.* 1983;39:1018-1020.
158. Björklund H, Dalsgaard CJ, Jonsson CE, Hermansson A. Sensory and autonomic innervation of nonhairy and hairy human skin. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.* 1986;243:51-57.
159. Pradhan Nabzdyk L, Kuchibhotla S, Guthrie P, Chun M, Auster ME, Nabzdyk C, Deso S, Andersen N, Gnardellis C, Logerfo FW, Veves A. Expression of neuropeptides and cytokines in a rabbit model of diabetic neuroischemic wound healing. *J Vasc Surg.* 2013;58:766-775.
160. Siebenhaar F, Sharov AA, Peters EM, Sharova TY, Syska W, Mardaryev AN, Freyschmidt-Paul P, Sundberg JP, Maurer M, Botchkarev VA. Substance P as an immunomodulatory neuropeptide in a mouse model for autoimmune hair loss (alopecia areata). *J Invest Dermatol.* 2007;127:1489-1497.
161. Hökfelt T, Vincent S, Dalsgaard CJ, Skirboll L, Johansson O, Schultzberg M, Jancso G. Distribution of substance P in brain and periphery and its possible role as a co-transmitter. *Ciba Found Symp.* 1982:84-106.

162. Baertschi AJ, Zingg HH, Dreifuss JJ. Enkephalins, substance P, bradykinin and angiotensin II: differential sites of action on the hypothalamoneurohypophysial system. *Brain Res.* 1981;220(1):107-119.
163. Chen LW, Yung KK, Chan YS. Neurokinin peptides and neurokinin receptors as potential therapeutic intervention targets of basal ganglia in the prevention and treatment of Parkinson's disease. *Curr Drug Targets.* 2004 Feb;5(2):197-206.
164. De Felipe C, Herrero JF, O'Brien JA, Palmer JA, Doyle CA, Smith AJ, Hunt SP. Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature.* 1998;392(6674):394-397.
165. Kramer MS, Cutler N, Feighner J, Shrivastava R, Carman J, Sramek JJ, Rupniak NM. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science.* 1998;281(5383):1640-1645.
166. Mantyh PW, Hunt SP, Maggio JE. Substance P receptors: localization by light microscopic autoradiography in rat brain using [3H]SP as the radioligand. *Brain Res.* 1984;307(1-2):147-165.
167. Yaraee R, Ebtekar M, Ahmadiani A, Sabahi F, Ghazanfari T. The effect of substance P on nitric oxide production by HSV-1 infected macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2007;7:135-139.
168. Staniek V, Misery L, Dezutter-Dambuyant C, Claudy A, Schmitt D. Expression of neuropeptides on human epidermal Langerhans cells. *Adv Exp Med Biol.* 1995;378:147-150.
169. Lambrecht BN, Germonpre PR, Everaert EG, Carro-Muino I, De Veerman M, de Felipe C, Hunt SP, Thielemans K, Joos GF, Pauwels RA. Endogenously produced substance P contributes to lymphocyte proliferation induced by dendritic cells and direct TCR ligation. *Eur J Immunol.* 1999;29:3815-3825.
170. O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. The role of substance P in inflammatory disease. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *J Cell Physiol.* 2004;201(2):167-180.
171. Riedel W, Neeck G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Z Rheumatol.* 2001 Dec;60(6):404-15.
172. DeVane CL. Substance P: a new era, a new role. *Pharmacotherapy.* 2001;21(9):1061-1069.

173. Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience*. 1988;24:739-768.
174. Harrison S, Geppetti P. Substance P. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001;33:555-576.
175. Lotz M, Carson DA, Vaughan JH. Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: Neural pathway in pathogenesis of arthritis. *Science*. 1987;235(4791):893-895.
176. Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Geppetti P, Alessandri G, Maggi CA. Substance P stimulates neovascularization in vivo and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res*. 1990;40(2):264-278.
177. Rameshwar P, Poddar A, Zhu G, Gascon P. Receptor induction regulates the synergistic effects of substance P with IL-1 and platelet-derived growth factor on the proliferation of bone marrow fibroblasts. *J Immunol*. 1987;158(7):3417-3424.
178. Fan TP, Hu DE, Guard S, Gresham GA, Watling KJ. Stimulation of angiogenesis by substance P and interleukin-1 in the rat and its inhibition by NK1 or interleukin-1 receptor antagonists. *Br J Pharmacol*. 1993;110(1):43-49.
179. González-Moles MA, Mosqueda-Taylor A, Esteban F, Gil-Montoya JA, Díaz-Franco MA, Delgado M, Muñoz M. Cell proliferation associated with actions of the substance P/NK-1 receptor complex in keratocystic odontogenic tumours. *Oral Oncol*. 2008;44:1127-1133.
180. Brener S, González-Moles MA, Tostes D, Esteban F, Gil-Montoya JA, Ruiz-Ávila I, Bravo M, Muñoz M. A role for the substance P/NK-1 receptor complex in cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2009;29:2323-2329.
181. Esteban F, González-Moles MA, Castro D, Martín-Jaén MM, Redondo M, Ruiz-Ávila I, Rosso M, Muñoz M. Expression of substance P and neurokinin-1-receptor in laryngeal cancer: linking chronic inflammation to cancer promotion and progression. *Histopathology*. 2009;54:258-260.
182. Muñoz M, Rosso M, Coveñas R. A new frontier in the treatment of cancer: NK-1 receptor antagonists. *Curr Med Chem*. 2010;17:504-516.
183. Muñoz M, Rosso M, Robles-Frías MJ, Salinas-Martín MV, Coveñas R. The NK-1 receptor is expressed in human melanoma and is involved in the antitumor action of the NK-1 receptor antagonist aprepitant on melanoma cell lines. *Lab Invest*. 2010;90:1259-1269.

184. Muñoz M, González-Ortega A, Rosso M, Robles-Frías MJ, Carranza A, Salinas-Martín MV, Coveñas R. The substance P/Neurokinin-1 receptor system in lung cancer: focus on the antitumor action of neurokinin-1 receptor antagonists. *Peptides*. 2012;38:318-325.
185. Friess H, Zhu Z, Liard V, Shi X, Shrikhande SV, Wang L, Lieb K, Korc M, Palma C, Zimmermann A, Reubi JC, Buchler MW. Neurokinin-1 receptor expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer. *Lab Invest*. 2003;83:731-742.
186. Muñoz M, Rosso M, Coveñas R, Montero I, González-Moles MA, Robles MJ. Neurokinin-1 receptors located in human retinoblastoma cell lines: antitumor action of its antagonist, L-732,138. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:2775-2781.
187. Singh D, Joshi DD, Hameed M, Qian J, Gascón P, Maloof PB, Mosenthal A, Rameshwar P. Increased expression of preprotachykinin-I and neurokinin receptors in human breast cancer cells: implications for bone marrow metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:388-393.
188. Fackler OT, Grosse R. Cell motility through plasma membrane blebbing. *J Cell Biol*. 2008;81:879-884.
189. Meshki J, Douglas SD, Lai JP, Schwartz L, Kilpatrick LE, Tuluc F. Neurokinin 1 receptor mediates membrane blebbing in HEK293 cells through a Rho/Rho-associated coiled-coil kinasedependent mechanism. *J Biol Chem*. 2009;284:9280-9289.
190. Muñoz M, Coveñas R. NK-1 receptor antagonists: a new generation of anticancer drugs. *Mini Rev Med Chem*. 2012;12(7):593-599.
191. Muñoz M, Martínez-Armesto J, Coveñas R. NK-1 receptor antagonists as antitumor drugs: a survey of the literature from 2000 to 2011. *Expert Opin Ther Pat*. 2012;22(7):735-746.
192. Muñoz M, Rosso M, Coveñas R. The NK-1 receptor: a new target in cancer therapy. *Curr Drug Targets*. 2011;12(6):909-921.
193. Folkers K, Hakanson R, Horig J, Xu JC, Leander S. Biological evaluation of substance P antagonists. *Br J Pharmacol*. 1984;83(2):449-456.
194. Folkers K, Feng DM, Asano N, Hakanson R, Weisenfeld-Hallin Z, Leander, S. Spantide II, an effective tachykinin antagonist having high potency and negligible neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87(12):4833-4835.

195. Williams BJ, Curtis NR, McKnight AT, Maguire JJ, Young SC, Veber DF, Baker R. Cyclic peptides as selective tachykinin antagonists. *J Med Chem.* 1993;36(1):2-10.
196. Quartara L, Maggi CA. The tachykinin NK-1R receptor. Part I: ligands and mechanisms of cellular activation. *Neuropeptides.* 1997 Dec;31(6):537-63.
197. Snider RM, Constantine JW, Lowe III JA, Longo KP, Lebel WS, Woody HA. A potent nonpeptide antagonist of the substance P (NK1) receptor. *Science.* 1991;251(4992):435-437.
198. Hargreaves R, Ferreira JC, Hughes D, Brands J, Hale J, Mattson B, Mills S. Development of aprepitant, the first neurokinin-1 receptor antagonist for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Ann NY Acad Sci.* 2011;1222:40-48.
199. Tattersall FD, Rycroft W, Cumberbatch M, et al. The novel NK-1 receptor antagonist MK-0869 (L-754,030) and its water soluble phosphoryl prodrug, L-758,298, inhibit acute and delayed cisplatin- induced emesis in ferrets. *Neuropharmacology.* 2000;39(4):652-663.
200. Navari RM. Fosaprepitant (MK-0517): a neurokinin-1 receptor antagonist for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 2007;16(12):1977-1985.
201. Poli-Bigelli S, Rodrigues-Pereira J, Carides AD, Julie Ma G, Eldridge K, Hipple A, Evans JK, Horgan KJ, Lawson F. Addition of the neurokinin 1 receptor antagonist aprepitant to standard antiemetic therapy improves control of chemotherapy-induced nausea and vomiting. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in Latin America. *Cancer.* 2003;97:3090-3098.
202. Hökfelt T, Broberger C, David Xu Z-Q, Sergeyev V, Ubink R, Diez M. Neuropeptides: an overview. *Neuropharmacology.* 2000;39:1337-1356.
203. Muñoz M, Coveñas R. Safety of neurokinin-1 receptor antagonists. *Expert Opin Drug Saf.* 2013b;12:673-685.
204. Fong TM, Yu H, Strader CD. Molecular basis for the species selectivity of the neurokinin-1 receptor antagonists CP-96,345 and RP-67,580. *J Biol Chem.* 1992;267:25668-25671.
205. Sachais BS, Snider RM, Lowe JA 3rd, Krause JE. Molecular basis for the species selectivity of the substance P antagonist CP- 96,345. *J Biol Chem.* 1993;268:2319-2323.

206. Keller M, Montgomery S, Ball W, Morrison M, Snavely D, Liu G, Hargreaves R, Hietala J, Lines C, Beebe K, Reines S. Lack of efficacy of the substance P (neurokinin-1 receptor) antagonist aprepitant in the treatment of major depressive disorder. *Biol Psychiatry*. 2006;59:216-223.
207. Reubi JC, Horisberger U, Kappeler A, Laissue JA. Localization of receptors for Vasoactive Intestinal Peptide, Somatostatin, and Substance P in distinct compartments of human lymphoid organs. *Blood*. 1998;92(1):191-197.
208. Goldbart AD, Mager E, Veling MC, et al. Neurotrophins and tonsillar hypertrophy in children with obstructive sleep apnea. *Pediatr Res*. 2007;62(4):489-494.
209. David Gozal D, Kim J, Bhattacharjee R, Goldman J, Kheirandish-Gozal L. Substance P and neurokinin 1 receptors as potential therapeutic targets in children with OSA. *Chest*. 2014;145(5):1039-1045.
210. Recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento en ORL. 2ª revisión. Servicio Andaluz de Salud, Consejería de Salud, Junta de Andalucía; 2004. p.11-12.
211. Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Dolara P, Maggi CA. NK1-receptors mediate the proliferative response of human fibroblasts to tachykinins. [In Vitro Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Br J Pharmacol*. 1990;100(1):11-14.
212. Payan DG, Brewster DR, Goetzl EJ. Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Immunol*. 1983;131(4):1613-1615.
213. Muñoz M, Rosso M, Casinello F, Coveñas R. Paravertebral anesthesia: how substance P and the NK-1 receptor could be involved in regional block and breast cancer recurrence. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;122(2):601-603. doi: 10.1007/s10549-010-0850-y.
214. Muñoz M, Coveñas R, Esteban F, Redondo M. The substance P/NK-1 receptor system: NK-1 receptor antagonists as anti-cancer drugs. *J Biosci*. 2015;40(2):441-463.
215. Lieb K, Fiebich BL, Berger M, Bauer J, Schulze-Osthoff K. The neuropeptide substance P activates transcription factor NFkappa B and kappa B-dependent gene expression in human astrocytoma cells. *J Immunol*. 1997;159:4952-4958.
216. Marriott I, Mason MJ, Elhogy A, Bost KL. Substance P activates NF-kappaB independent of elevations in intracellular calcium in murine macrophages and dendritic cells. *J Neuroimmunol*. 2000;102:163-171.

217. Koh YH, Tamizhselvi R, Bhatia M. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 and c-Jun NH₂-terminal kinase, through nuclear factor-kappaB and activator protein-1, contribute to caerulein-induced expression of substance P and neurokinin-1 receptors in pancreatic acinar cells. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;332(3):940-948.
218. Luo W, Sharif TR, Sharif M. Substance P-induced mitogenesis in human astrocytoma cells correlates with activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Cancer Res*. 1996;56(21):4983-4991.
219. Walczak-Drzewiecka A, Ratajewski M, Wagner W, Dastyk J. HIF-1alpha is up-regulated in activated mast cells by a process that involves calcineurin and NFAT. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Immunol*. 2008;181(3):1665-1672.
220. Hepler JR, Gilman AG. G proteins. *Trends Biochem Sci*. 1992;17:383-387.
221. Clapham D, Neer EJ. New roles: G protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature*. 1993;365:406.
222. DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Déry O, Mullins RD, Bunnett NW. β -arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol*. 2000;148(6):1267-81.
223. Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Switching of the coupling of the β 2-adrenergic receptor to different g proteins by protein kinase A. *Nature*. 1997;390(6655):88-91.
224. Luttrell LM, Ferguson SSG, Daaka Y et al. β -arrestin-independent formation of β 2 adrenergic receptor-src protein kinase complexes. *Science*. 1999;283(5402):655-661.
225. Muñoz M, Muñoz MF, Ayala A. Immunolocalization of Substance P and NK-1 Receptor in ADIPOSE Stem Cells. *J Cell Biochem*. 2017;118(12):4686-4696.
226. Bubak AN, Como CN, Blackmon AM, Frieze S, Mescher T, Jones D, Cohrs RJ, Paucek P, Baird NL, Nagel MA. Varicella Zoster Virus Induces Nuclear Translocation of the Neurokinin-1 Receptor, Promoting Lamellipodia Formation and Viral Spread in Spinal Astrocytes. *J Infect Dis*. 2018;218(8):1324-1335.
227. Lembeck F, Donnerer J, Tsuchiya M, Nagahisa A. The nonpeptide tachykinin antagonist, CP-96.345, is a potent inhibitor of neurogenic inflammation. *Br J Pharmacol*. 1992;105:527-530.

228. Rittner HL, Lux C, Labuz D, Mousa SA, Achäfer M, Stein C, Brack A. Neurokinin-1 receptor antagonists inhibit the recruitment of opioid-containing leukocytes and impair peripheral antinociception. *Anesthesiology*. 2007;107:1009-1017.
229. Haines KA, Kolasinski SL, Cronstein BN, Reibman J, Gold LI, Weissmann G. Chemoattraction of neutrophils by substance P and transforming growth factor-beta 1 is inadequately explained by current models of lipid remodeling. *J Immunol*. 1993;151(3):1491-1499.
230. Kahler CM, Sitte BA, Reinisch N, Wiedermann CJ. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by substance P. *Eur J Pharmacol*. 1993;249(3):281-286.
231. Schratzberger P, Reinisch N, Prodinger WM, Kahler CM, Sitte BA, Bellmann R, Fischer-Colbrie R, Winkler H, Wiedermann CJ. Differential chemotactic activities of sensory neuropeptides for human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol*. 1997;158(8):3895-3901.
232. Lai JP, Douglas SD, Rappaport E, Wu JM, Ho WZ. Identification of a delta isoform of preprotachykinin mRNA in human mononuclear phagocytes and lymphocytes. *J Neuroimmunol*. 1998;91:121-128.
233. Stanisz AM, Befus D, Bienenstock J. Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferations by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, and spleen. *J Immunol*. 1986;136(1):152-156.
234. Lotz M, Vaughan JH, Carson DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science*. 1988;241(4870):1218-1221.
235. Scicchitano R, Bienenstock J, Stanisz AM. In vivo immunomodulation by the neuropeptide substance P. *Immunology*. 1988;63(4):733-735.
236. Pascual DW, Xu-Amano JC, Kiyono H, McGhee JR, Bost KL. Substance P acts directly upon cloned B lymphoma cells to enhance IgA and IgM production. *J Immunol*. 1991;146(7):2130-2136.
237. Bost KL, Pascual DW. 1992. Substance P: A late-acting B lymphocyte differentiation cofactor. *Am J Physiol*. 1992;262(3 Pt 1):C537-C545.
238. Calvo CF, Chavanel G, Senik A. 1992. Substance P enhances IL-2 expression in activated human T cells. *J Immunol*. 1992;148(11):3498-3504.

239. Ansel JC, Brown JR, Payan DG, Brown MA. Substance P selectively activates TNF-alpha gene expression in murine mast cells. *J Immunol.* 1993;150(10):4478-4485.
240. Covas MJ, Pinto LA, Victorino RM. Disturbed immunoregulatory properties of the neuropeptide substance P on lymphocyte proliferation in HIV infection. *Clin Exp Immunol.* 1994;96(3):384-388.
241. Ho WZ, Kaufman D, Uvaydova M, Douglas SD. Substance P augments interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha release by human cord blood monocytes and macrophages. *J Neuroimmunol.* 1996;71(1-2):73-80.
242. Maggi CA. The effects of tachykinins on inflammatory and immune cells. *Regul Pept.* 1997;70(2-3):75-90.
243. Holzer P, Holzer-Petsche U. Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion, and inflammation. *Pharmacol Ther.* 1997;73(3):219-263.
244. Payan DG, Goetzl EJ. Modulation of lymphocyte function by sensory neuropeptides. *J Immunol.* 1985;135(2 Suppl):783s-786s.
245. Katsanos GS, Anogeianaki A, Orso C, Tete S, Salini V, Antinolfi PL, Sabatino G. Impact of substance P on cellular immunity. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2008;22:93-98.
246. Guo CJ, Lai JP, Luo HM, Douglas SD, Ho WZ. Substance P up-regulates macrophage inflammatory protein-1beta expression in human T lymphocytes. *J Neuroimmunol.* 2002;131:160-167.
247. Blum A, Setiawan T, Hang L, Stoyanoff K, Weinstock JV. Interleukin-12 (IL-12) and IL-23 induction of substance p synthesis in murine T cells and macrophages is subject to IL-10 and transforming growth factor beta regulation. *Infect Immun.* 2008;76:3651-3656.
248. Blum AM, Metwali A, Crawford C, Li J, Qadir K, Elliott DE, Weinstock JV. Interleukin 12 and antigen independently induce substance P receptor expression in T cells in murine schistosomiasis mansoni. *FASEB J.* 2001;15:950-957.
249. Eglezos A, Andrews PV, Boyd RL, Helme RD. Effects of capsaicin treatment on immunoglobulin secretion in the rat: further evidence for involvement of tachykinin-containing afferent nerves. *J Neuroimmunol.* 1990;26:131-138.
250. Hazlett LD, McClellan SA, Barrett RP, Liu J, Zhang Y, Lighvani S. Spantide I decreases type I cytokines, enhances IL-10, and reduces corneal perforation in

- susceptible mice after *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:797-807.
251. Rameshwar P, Gascon P, Ganea D. Stimulation of IL-2 production in murine lymphocytes by substance P and related tachykinins. *J Immunol.* 1993;151:2484-2496.
 252. Bignami F, Giacomini C, Lorusso A, Aramini A, Rama P, Ferrari G. NK1 receptor antagonists as a new treatment for corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55:6783-6794.
 253. Croitoru K, Ernst PB, Bienenstock J, Padol I, Stanisiz AM. Selective modulation of the natural killer activity of murine intestinal intraepithelial leucocytes by the neuropeptide substance P. *Immunology.* 1990;71(2):196-201.
 254. Cunin P, Caillon A, Corvaisier M, Garo E, Scotet M, Blanchard S, Delneste Y, Jeannin P. The tachykinins substance P and hemokinin-1 favor the generation of human memory Th17 cells by inducing IL-1beta, IL-23, and TNF-like 1A expression by monocytes. *J Immunol.* 2011;186:4175-4182.
 255. Cook GA, Elliott D, Metwali A, Blum AM, Sandor M, Lynch R, Weinstock JV. Molecular evidence that granuloma T lymphocytes in murine schistosomiasis *mansoni* express an authentic substance P (NK-1) receptor. *J Immunol.* 1994;152:1830-1835.
 256. Blum AM, Metwali A, Elliott DE, Weinstock JV. T cell substance P receptor governs antigen-elicited IFN-gamma production. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284:G197-204.
 257. Chu HW, Kraft M, Krause JE, Rex MD, Martin RJ. Substance P and its receptor neurokinin 1 expression in asthmatic airways. [Clinical Trial Controlled Clinical Trial Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(4):713-722.
 258. Reid TW, Murphy CJ, Iwahashi CK, Foster BA, Mannis MJ. Stimulation of epithelial cell growth by the neuropeptide substance P. *J Cell Biochem.* 1993;52(4):476-85.
 259. Yaraee R, Ghazanfari T. Substance P potentiates TGFbeta-1 production in lung epithelial cell lines. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2009;8(1):19-24.
 260. Goode T, O'Connell J, Anton P, Wong H, Reeve J, O'Sullivan G C, Shanahan F. Neurokinin-1 receptor expression in inflammatory bowel disease: molecular quantitation and localisation. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research

- Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Gut*. 2000;47(3):387-396.
261. Mantyh CR, Vigna SR, Bollinger RR, Mantyh PW, Maggio JE, Pappas TN. Differential expression of substance P receptors in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Gastroenterology*.1995;109(3):850-860.
 262. Mantyh CR, Vigna SR, Maggio JE, Mantyh PW, Bollinger RR, Pappas TN. Substance P binding sites on intestinal lymphoid aggregates and blood vessels in inflammatory bowel disease correspond to authentic NK-1 receptors. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Neurosci Lett*. 1994;178(2):255-259.
 263. Mantyh PW, Mantyh CR, Gates T, Vigna SR, Maggio JE. Receptor binding sites for substance P and substance K in the canine gastrointestinal tract and their possible role in inflammatory bowel disease. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Neuroscience* 1988;25(3):817-837.
 264. Renzi D, Pellegrini B, Tonelli F, Surrenti C, Calabro A. Substance P (neurokinin-1) and neurokinin A (neurokinin-2) receptor gene and protein expression in the healthy and inflamed human intestine. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Am J Pathol*. 2000;157(5):1511-1522.
 265. Koon HW, Pothoulakis C. Immunomodulatory properties of substance P: the gastrointestinal system as a model. [Review]. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1088:23-40.
 266. Watanabe M, Nakayasu K, Iwatsu M, Kanai A. Endogenous substance P in corneal epithelial cells and keratocytes. *Jpn J Ophthalmol*. 2002;46:616-620.
 267. Tran MT, Lausch RN, Oakes JE. Substance P differentially stimulates IL-8 synthesis in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:3871-3877.
 268. Sloniecka M, Le Roux S, Zhou Q, Danielson P. Substance P Enhances Keratocyte Migration and Neutrophil Recruitment through Interleukin-8. *Mol Pharmacol*. 2016;89:215-225.
 269. Suvas S. Role of Substance P Neuropeptide in Inflammation, Wound Healing, and Tissue Homeostasis. *J Immunol*. 2017;199(5):1543-1552.

270. Nishida T, Nakamura M, Ofuji K, Reid TW, Mannis MJ, Murphy CJ. Synergistic effects of substance P with insulin-like growth factor-1 on epithelial migration of the cornea. *J Cell Physiol.* 1996;169:159-166.
271. Nagano T, Nakamura M, Nakata K, Yamaguchi T, Takase K, Okahara A, Ikuse T, Nishida T. Effects of substance P and IGF-1 in corneal epithelial barrier function and wound healing in a rat model of neurotrophic keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:3810-3815.
272. Nakamura M, Kawahara M, Nakata K, Nishida T. Restoration of corneal epithelial barrier function and wound healing by substance P and IGF-1 in rats with capsaicin-induced neurotrophic keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:2937-2940.
273. Yang L, Sui W, Li Y, Qi X, Wang Y, Zhou Q, Gao H. Substance P Inhibits Hyperosmotic Stress-Induced Apoptosis in Corneal Epithelial Cells through the Mechanism of Akt Activation and Reactive Oxygen Species Scavenging via the Neurokinin-1 Receptor. *PLoS One.* 2016;11:e0149865.
274. Ko JA, Murata S, Nishida T. Up-regulation of the tight-junction protein ZO-1 by substance P and IGF-1 in A431 cells. *Cell Biochem Funct.* 2009;27:388-394.
275. Ko JA, Yanai R, Nishida T. Up-regulation of ZO-1 expression and barrier function in cultured human corneal epithelial cells by substance P. *FEBS Lett.* 2009;583:2148-2153.
276. Araki-Sasaki K, Aizawa S, Hiramoto M, Nakamura M, Iwase O, Nakata K, Sasaki Y, Mano T, Handa H, Tano Y. Substance P-induced cadherin expression and its signal transduction in a cloned human corneal epithelial cell line. *J Cell Physiol.* 2000;182:189-195.
277. Gaddipati S, Rao P, Jerome AD, Burugula BB, Gerard NP, Suvas S. Loss of Neurokinin-1 Receptor Alters Ocular Surface Homeostasis and Promotes an Early Development of Herpes Stromal Keratitis. *J Immunol.* 2016; 197.
278. Bost KL, Breeding SA, Pascual DW. Modulation of the mRNAs encoding substance P and its receptor in rat macrophages by LPS. *Reg Immunol.* 1992;4:105-112.
279. Germonpre PR, Bullock GR, Lambrecht BN, Van De Velde V, Luyten WH, Joos GF, Pauwels RA. Presence of substance P and neurokinin 1 receptors in human sputum macrophages and U-937 cells. *Eur Respir J.* 1999;14:776-782.

280. Bill A, Stjernschantz J, Mandahl A, Brodin E, Nilsson G. Substance P: Release on trigeminal nerve stimulation, effects in the eye. *Acta Physiol Scand.* 1979;106(3):371-373.
281. Murriss-Espin M, Pinelli E, Pipy B, Leophonte P, Didier A. Substance P and alveolar macrophages: Effects on oxidative metabolism and eicosanoid production. *Allergy.* 1995;50(4):334-339.
282. Bar-Shavit Z, Goldman R, Stabinsky Y, Gottlieb P, Fridkin M, Teichberg VI, Blumberg S. Enhancement of phagocytosis - a newly found activity of substance P residing in its N-terminal tetrapeptide sequence. *Biochem Biophys Res Commun.* 1980;94:1445-1451.
283. Chernova I, Lai JP, Li H, Schwartz L, Tuluc F, Korchak HM, Douglas SD, Kilpatrick LE. Substance P (SP) enhances CCL5-induced chemotaxis and intracellular signaling in human monocytes, which express the truncated neurokinin-1 receptor (NK1R). *J Leukoc Biol.* 2009;85:154-164.
284. JP, Ho WZ, Kilpatrick LE, Wang X, Tuluc F, Korchak HM, Douglas SD. Full-length and truncated neurokinin-1 receptor expression and function during monocyte/macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:7771-7776.
285. Lai JP, Ho WZ, Yang JH, Wang X, Song L, Douglas SD. A non-peptide substance P antagonist down-regulates SP mRNA expression in human mononuclear phagocytes. *J Neuroimmunol.* 2002;128:101-108.
286. Tuluc F, Meshki J, Spitsin S, Douglas SD. HIV infection of macrophages is enhanced in the presence of increased expression of CD163 induced by substance P. *J Leukoc Biol.* 2014;96:143-150.
287. Azzari C, Rossi ME, Resti M, Caldini AL, Lega L, Galli L, Fico E, Vierucci A. Changed levels of substance P and somatostatin in HIV-positive children. *Pediatr Med Chir.* 1992;14:577-581.
288. Manak MM, Moshkoff DA, Nguyen LT, Meshki J, Tebas P, Tuluc F, Douglas SD. Anti-HIV-1 activity of the neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant and synergistic interactions with other antiretrovirals. *AIDS.* 2010;24:2789-2796.
289. Tebas P, Spitsin S, Barrett JS, Tuluc F, Elci O, Korelitz JJ, Wagner W, Winters A, Kim D, Catalano R, Evans DL, Douglas SD. Reduction of soluble CD163, substance P, programmed death 1 and inflammatory markers: phase 1B trial of aprepitant in HIV-1-infected adults. *Aids.* 2015;29:931-939.

290. Lai JP, Ho WZ, Zhan GX, Yi Y, Collman RG, Douglas SD. Substance P antagonist (CP-96,345) inhibits HIV-1 replication in human mononuclear phagocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:3970-3975.
291. Wang X, Douglas SD, Lai JP, Tuluc F, Tebas P, Ho WZ. Neurokinin-1 receptor antagonist (aprepitant) inhibits drug-resistant HIV-1 infection of macrophages in vitro. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2007;2:42-48.
292. Marriott I, Bost KL. Expression of authentic substance P receptors in murine and human dendritic cells. *J Neuroimmunol*. 2001;114:131-141.
293. Takashima A. Harnessing DCs by substance P. *Blood*. 2013;121:2815-2816.
294. Janelsins BM, Sumpter TL, Tkacheva OA, Rojas-Canales DM, Erdos G, Mathers AR, Shufesky WJ, Storkus WJ, Falo LD Jr. Morelli AE, Larregina AT. Neurokinin-1 receptor agonists bias therapeutic dendritic cells to induce type 1 immunity by licensing host dendritic cells to produce IL-12. *Blood*. 2013;121:2923-2933.
295. Mathers AR, Tkacheva OA, Janelsins BM, Shufesky WJ, Morelli AE, Larregina AT. In vivo signaling through the neurokinin 1 receptor favors transgene expression by Langerhans cells and promotes the generation of Th1- and Tc1-biased immune responses. *J Immunol*. 2007;178:7006-7017.
296. Janelsins BM, Mathers AR, Tkacheva OA, Erdos G, Shufesky WJ, Morelli AE, Larregina AT. Proinflammatory tachykinins that signal through the neurokinin 1 receptor promote survival of dendritic cells and potent cellular immunity. *Blood*. 2009;113:3017-3026.
297. Kradin R, MacLean J, Duckett S, Schneeberger EE, Waeber C, Pinto C. Pulmonary response to inhaled antigen: neuroimmune interactions promote the recruitment of dendritic cells to the lung and the cellular immune response to inhaled antigen. *Am J Pathol*. 1997;150:1735-1743.
298. Mashaghi A, Marmalidou A, Tehrani M, Grace PM, Pothoulakis C, Dana R. Neuropeptide substance P and the immune response. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(22):4249-4264.