



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA DISFAGIA OROFARÍNGEA ASOCIADA A ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS Y AL ENVEJECIMIENTO

Línea de investigación: Nuevos tratamientos neurofisiológicos para pacientes con disfagia neurógena y asociada al envejecimiento

Tesis doctoral presentada por Daniel Alvarez Berdugo
para optar al grado de Doctor

Programa de Doctorado en Neurociencias (UAB)

Mayo 2017

Director: Dr. Pere Clavé Civit



Unitat d'Exploracions Funcionals Digestives



PERE CLAVÉ CIVIT,

Director Académico, de Investigación e Innovación y Jefe de la Unidad de Exploraciones Funcionales Digestivas del Hospital de Mataró (Consorti Sanitari del Maresme), Profesor Asociado del Departamento de Cirugía de la Universidad Autónoma de Barcelona e IP del grupo CIBERehd CSdM-UAB.

HACE CONSTAR:

Que la memoria titulada "Caracterización de nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento farmacológico de la disfagia orofaríngea asociada a enfermedades neurológicas y al envejecimiento" presentada por DANIEL ALVAREZ BERDUGO para optar al grado de Doctor, llevada a cabo en el Grupo de Investigación CIBERehd del Hospital de Mataró, se ha realizado bajo mi dirección, y al considerarla finalizada, autorizo su presentación para ser evaluada por el tribunal correspondiente.

Y para que conste a tales efectos firmamos la presente,

Hospital de Mataró, 24 de mayo de 2017.

Dr. Pere Clavé i Civit
Director de la Tesis

Dra. Maria Teresa Martín Ibáñez
Tutora de la Tesis

Daniel Alvarez Berdugo
Doctorando



Unitat d'Exploracions Funcionals Digestives



A mi familia



Agradecimientos

Ahora que estoy en la recta final de la Tesis, echo la vista atrás y veo que estos años han sido como una larga carrera, en ocasiones de obstáculos y en otras de fondo, una maratón. Si he logrado llegar hasta aquí y completar esta etapa de mi vida ha sido gracias a toda la gente que la ha vivido conmigo y a quien tengo tanto que agradecer.

Si ahora estoy en el final no puedo menos que recordar mi inicio, mi base y mi apoyo continuo: mi familia. Agradezco a mis padres y a mi hermano todo lo que me han dado en la vida. También quiero agradecer a mi abuela Anita, a quién no he podido ver tanto estos últimos meses y recordar a mi abuela Dolores que falleció durante este periodo.

Cuando alcanzaba los obstáculos de esta carrera he podido superarlos en gran parte por el apoyo de mis amigas Rosa, Marta y Ruzanna; alguna más cercana que otra pero todas ellas han conseguido darle color a los días más grises.

Si algo me ha permitido llegar hasta el final no tengo duda que han sido mis compañeros y compañeras de trabajo, que como si fuera una carrera de relevos han estado ahí siempre que los he necesitado. Mención especial para Laia, que me ha guiado durante todos estos años y a quien no podré agradecer suficiente todo lo que ha hecho por mí. Pero también quiero agradecer a Omar, Lluís, Alberto, Claudia, Jane y Viri que han estado durante todo este trayecto, así como también a aquellos que se han ido buscando nuevas metas; Natàlia, Diana, Jakub e Irene. También quiero agradecer a las últimas compañeras que han llegado y a quien deseo que su estancia aquí sea, como mínimo, tan buena como lo ha sido la mía; Noemí, Mar, Alicia, Alba, Ana, Mireia, Vivi, os deseo lo mejor. No puedo dejar de agradecer también a las estudiantes de prácticas que han supuesto una gran ayuda durante esta tesis; Alicia, Alba y Sara, espero que logréis todo lo que os propongáis.

Esta tesis no habría podido realizarse sin el apoyo del Hospital de Mataró como institución y sus magníficos trabajadores, compañeros, que me han ayudado en todo lo que he necesitado. Quiero agradecer especialmente al Dr Casamitjana, Dra Enrique, Dr Chamizo y al resto del servicio de otorrinolaringología su ayuda con las muestras, así como también a la Dra Admella, la Dra Padrón, a Silvia, Estivaliz, M^a Pau, Jesús y al servicio de Anatomía Patológica en conjunto su ayuda con la histología. Extiendo este agradecimiento al resto de servicios con los que he trabajado: Neurología, Farmacia, Recerca, ha sido un placer poder trabajar con vosotros.

Durante estos años ha habido momentos en los que no he visto las cosas claras o el paso ha sido menos firme, por eso quiero agradecer al Dr Badia y a los Dres López de Vega y Auleda por ayudarme a superar estos problemas.

Por último, a mi director, Pere Clavé, le agradezco antes que nada el haber confiado en mí, el haberme dado esta oportunidad y el haberme puesto en contacto con el resto de compañeros; pero también le agradezco su paciencia y su guía, aunque en muchas ocasiones no nos pudiéramos de acuerdo, su constancia y su dirección han logrado que pudiera completar este proyecto. Por todo esto, muchas gracias Pere.



PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Parte de los resultados obtenidos durante el proceso de investigación que ha llevado a la elaboración de esta tesis doctoral han sido publicados previamente en revistas científicas indexadas:

Artículos originales

Anexo 3:

Alvarez-Berdugo D, Rofes L, Farré R, Casamitjana JF, Enrique A, Chamizo J, et al. Localization and expression of TRPV1 and TRPA1 in the human oropharynx and larynx. *Neurogastroenterol Motil.* 2016 Jan 4;28(1):91–100.

Anexo 4:

Alvarez-Berdugo D, Jiménez M, Clavé P, Rofes L. Pharmacodynamics of TRPV1 agonists in a bioassay using human PC-3 cells. *Sci World J.* 2014;2014.

Artículos de revisión

Anexo 1:

Alvarez-Berdugo D, Rofes L, Casamitjana JF, Padrón A, Quer M, Clavé P. Oropharyngeal and laryngeal sensory innervation in the pathophysiology of swallowing disorders and sensory stimulation treatments. *Ann NY Acad Sci.* 2016 Sep 21;1380(1):104–20.



ABREVIACIONES

ACTBh: *Human actine beta*

ASIC3: *Acid-sensing ion channel 3*

cDNA: *Complementary deoxyribonucleic acid*

CGRP: *Calcitonin gene-related peptide*

CPG: *Central pattern generator*

DEPC: *Diethyl pyrocarbonate*

DNA: *deoxyribonucleic acid*

DO: *Disfagia orofaríngea*

DSG: *Dorsal swallowing group*

EC50: *Half maximum effective concentration*

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*

EES: *Esfínter esofágico superior*

GMP: *Guanosine monophosphate*

GPJO: *Glossopalatal junction opening*

HBBS: *Hank's balanced salt solution*

ICD: *International Classification of Diseases*

IHC: *Immunohistochemistry*

IMP: *Inosine monophosphate*

L-IX: *Rama lingual del nervio glossofaríngeo*

LVC: *Laryngeal vestibule closure*

MECV-V: *Método de evaluación clínica volumen-viscosidad*

mRNA: *Messenger ribonucleic acid*

NC: *Nervio craneal*

NL: *Nervio lingual*

NLSI: *Nervio laríngeo superior interno*

NSE: *Neuron-specific enolase*

NTS: *Núcleo del tracto solitario*

OCT: *Optimal cutting temperature*

OMS: *Organización Mundial de la Salud*

PBS: *Phosphate buffered saline*

PCR: *Polymerase chain reaction*

Ph-IX: *Rama faríngea del nervio glossofaríngeo*

Ph-X: *Rama faríngea del nervio vago*

RMO: *Respuesta motora orofaríngea*

RNA: *Ribonucleic acid*

ROI: *Region of interest*

RT-qPCR: *Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*

SGP: *Sello glosopalatino*

SNC: *Sistema nervioso central*

SP: *Substance P*

SSQ: *Sydney Swallow Questionnaire*

TRP: *Transient receptor potential*

TRPV1: *Transient receptor potential family V member 1*

TRPA1: *Transient receptor potential family A member 1*

TRPM8: *Transient receptor potential family M member 8*

UESO: *Upper esophageal sphincter opening*

UPL: *Universal Probe Library*

VFS: *Videofluoroscopia*

VL: *Vestíbulo laríngeo*

VSG: *Ventral swallowing group*

ÍNDICE

ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN	15
1. Anatomía de los órganos de la deglución	18
1.1. Cavidad oral y lengua	18
1.2. Faringe	20
1.3. Laringe	21
1.4. Esófago	22
2. Innervación orofaríngea	23
2.1. Anatomía de la innervación sensorial orofaríngea	23
2.2. Histología de la mucosa orofaríngea	27
2.3. Estructuras especializadas de la innervación sensorial orofaríngea	77
3. Fisiología de la deglución	31
3.1. Respuesta Motora Orofaríngea (RMO)	31
3.2. Neurofisiología de la deglución	32
4. Disfagia Orofríngea	34
4.1. Descripción	34
4.2. Prevalencia	34
4.3. Fisiopatología	35
5. Tratamientos de la disfagia orofaríngea	37
5.1. Práctica clínica habitual	37
5.2. Nuevos tratamientos sensoriales	38
5.3. Tratamiento sensorial mecánico y térmico	38
5.4. Tratamiento sensorial eléctrico. Estimulación eléctrica intrafaríngea y transcutánea	38
5.5. Tratamiento sensorial farmacológico	39
6. Potenciales dianas farmacológicas	40
6.1. TRPV1	41
6.2. TRPA1	42
6.3. TRPM8	43
6.4. Otros receptores	43
6.5. El futuro del tratamiento farmacológico de la DO	44
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS	51
1. Muestras biológicas	53
1.1. Muestras biológicas para histología colorimétrica	54
1.2. Muestras biológicas para inmunohistoquímica fluorimétrica	55
1.3. Muestras biológicas para biología molecular	55
2. Métodos histología	55
2.1. Tinciones colorimétricas	55
2.2. Tinciones fluorimétricas	57
3. Métodos biología molecular	59
3.1. Extracción RNA. Método Trizol	59
3.2. Extracción RNA. Método en columna RNeasy® de Qiagen	60

3.3. Tratamiento con DNAsa	61
3.4. Retrotranscripción	61
3.5. RT-qPCR	61
4. Métodos farmacodinámica in vitro	62
5. Estudios clínicos en pacientes con disfagia orofaríngea	63
6. Método instrumental de estudio de la deglución	64
7. Métodos estadísticos y de análisis	66
7.1. Estudios de Biología Molecular	66
7.2. Farmacodinámica in vitro	67
7.3. Estudios clínicos	67
Resultados	69
Capítulo 1: Localización y expresión de los receptores sensoriales en la orofaringe	71
1.1. Estructura de la mucosa orofaríngea	74
1.2. Inervación de la mucosa orofaríngea	76
1.3. Localización y expresión de TRPV1, TRPA1, TRPM8 y ASIC3	79
1.4. Resumen de los resultados	86
Capítulo 2: Farmacodinámica de los agonistas TRPV1	87
2.1. Curvas dosis-respuesta	89
2.2. Desensitización y efecto de un agonista específico	90
2.3. Resumen de los resultados	91
Capítulo 3: Estudio comparativo de la eficacia clínica de los tratamientos farmacológicos	93
3.1. Demografía	95
3.2. Fisiopatología	95
3.3. Efecto del tratamiento	96
3.4. Resumen de los resultados	100
DISCUSIÓN	101
1. Histología y biología molecular de la percepción sensorial orofaríngea	103
1.1. Estructura e inervación de la mucosa orofaríngea	104
1.2. Expresión y localización de los receptores sensoriales	104
2. Farmacodinámica de los agonistas de TRPV1 y TRPA1	107
3. Comparación del efecto clínico de los tratamientos	108
4. Mecanismo de acción de los estimulantes	110
5. Perspectivas de futuro	112
CONCLUSIÓN	113
REFERENCIAS	117
ANEXOS	131
1. Oropharyngeal and laryngeal sensory innervation in the pathophysiology of swallowing disorders and sensory stimulation treatments	133
2. Resoluciones del CEIC	151
3. Localization and expression of TRPV1 and TRPA1 in the human oropharynx and larynx	157
4. Pharmacodynamics of TRPV1 agonists in a bioassay using human PC-3 cells	167



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Nutrirse e hidratarse son procesos básicos para el mantenimiento de las funciones vitales en los seres vivos. La deglución en humanos se produce en un segundo gracias al movimiento coordinado de hasta 30 pares de músculos de la boca, faringe, laringe y esófago. Los estímulos sensoriales percibidos durante la deglución juegan un papel primordial, no sólo en el placer de la alimentación sino también en la propia fisiología de la deglución, permitiendo que la respuesta deglutoria sea adecuada y se adapte a las características del bolo.

Existen múltiples comorbilidades que pueden alterar la correcta función deglutoria, provocando así dificultades para transportar el bolo alimentario y los líquidos de la boca al esófago de forma segura y eficaz. Estos síntomas se conocen como disfagia orofaríngea (DO) y son muy prevalentes en ancianos, pacientes que han tenido un ictus, pacientes con enfermedades neurodegenerativas o distrofias musculares y pacientes que han padecido enfermedades o han tenido intervenciones otorrinolaringológicas. Actualmente el tratamiento de estos pacientes se basa en la compensación con espesantes, posturas y maniobras y la rehabilitación logopédica, pero no existen tratamientos farmacológicos que permitan mejorar la fisiología alterada de estos pacientes.

El objeto de estudio de esta Tesis Doctoral son los ancianos, pacientes de ictus y enfermedades neurodegenerativas con DO, ya que en estos casos se ha observado una importante pérdida de sensibilidad orofaríngea que está relacionada con la fisiopatología de esta enfermedad. Por este motivo pensamos que es importante estudiar los mecanismos sensoriales de la orofaringe y buscar posibles tratamientos farmacológicos que contrarresten la pérdida de sensibilidad en estos pacientes.

Esta Tesis aborda de forma integrada la investigación básica y clínica de potenciales dianas y tratamientos farmacológicos de la DO que sirvan como base para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para pacientes con DO asociada a alteraciones de la sensibilidad orofaríngea.

1. Anatomía de los órganos de la deglución

1.1. Cavidad oral y lengua

Son las estructuras situadas en la primera sección del tubo digestivo. Intervienen en los procesos de masticación, insalivación, deglución, degustación, articulación del habla y resonancia de la voz (**Figura 1**).

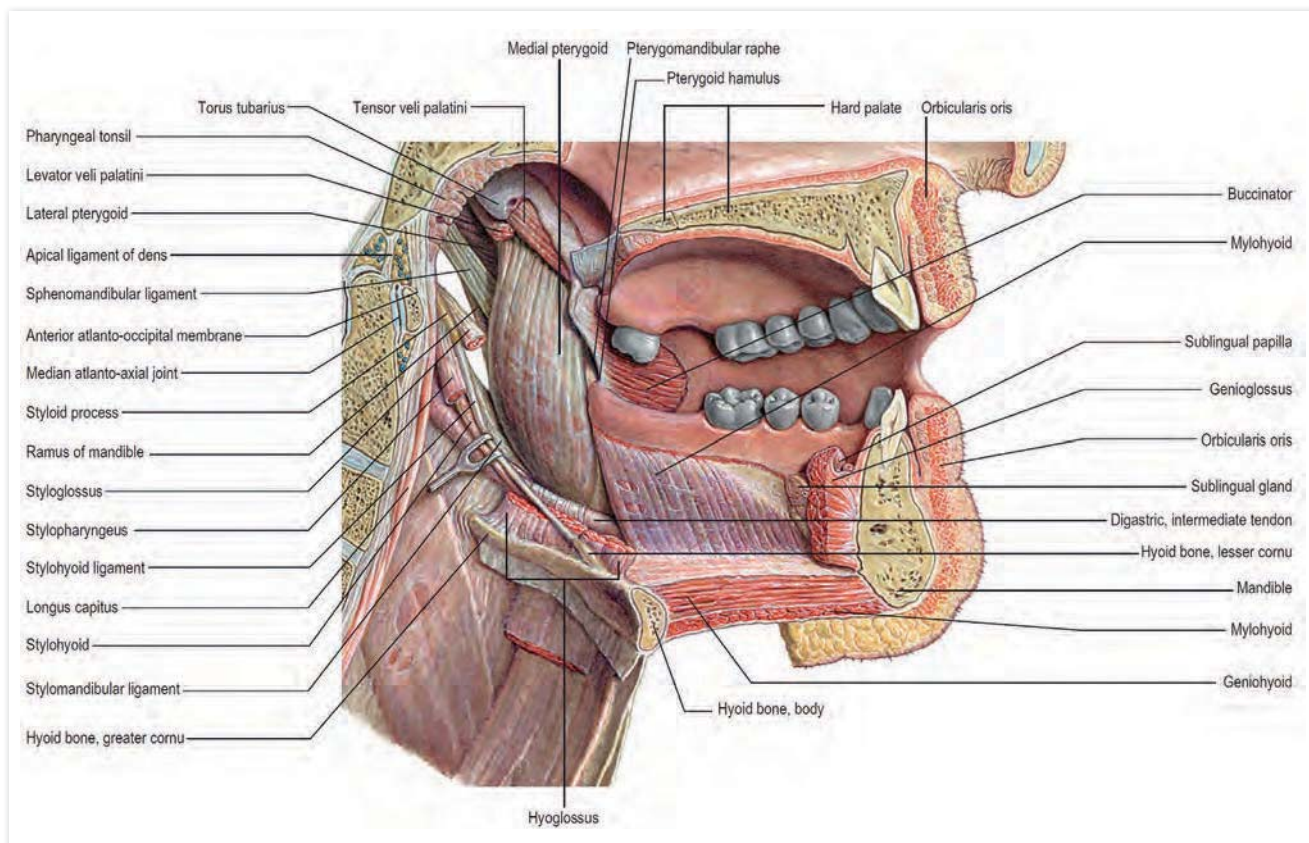


Figura 1. Anatomía de la cavidad oral. Imagen reproducida de Standring et al (2008) (1).

- **Vestíbulo bucal:** es el espacio periférico de la cavidad oral delimitado por los labios, las mejillas y los arcos gingivodentarios. Está abierto al exterior mediante el labio superior y el inferior que, al encontrarse cerrados, forman el sello labial.
- **Cavidad bucal:** es el espacio central de la cavidad oral delimitada por delante y los laterales por los arcos gingivodentarios, por arriba por la bóveda palatina y por debajo por el suelo de la boca. En su parte posterior la cavidad bucal está conectada a la orofaringe por el istmo de las fauces. Los dos tercios anteriores de la bóveda palatina están formados por el paladar duro, compuesto por los huesos maxilar y palatinos y una capa glandular, y está recubierto por una capa de mucosa masticatoria. El tercio posterior de la bóveda palatina está formada por el paladar blando, que es un tabique músculo-membranoso que separa la cavidad bucal de la nasofaringe y marca la frontera entre la nasofaringe y la orofaringe; está cubierto por una capa de mucosa de recubrimiento. En su parte posterior, el paladar blando se extiende centralmente formando la úvula y lateralmente en cuatro pilares, dos anteriores (arcos palatoglosos) y dos posteriores del velo del paladar (arcos palatofaríngeos).
- **Suelo de la boca:** superficie delimitada anteriormente por el hueso maxilar y posteriormente por el hueso hioides. Está formado por los músculos milohioideos, digástrico y geniohioides que participan en la tracción del hioides.

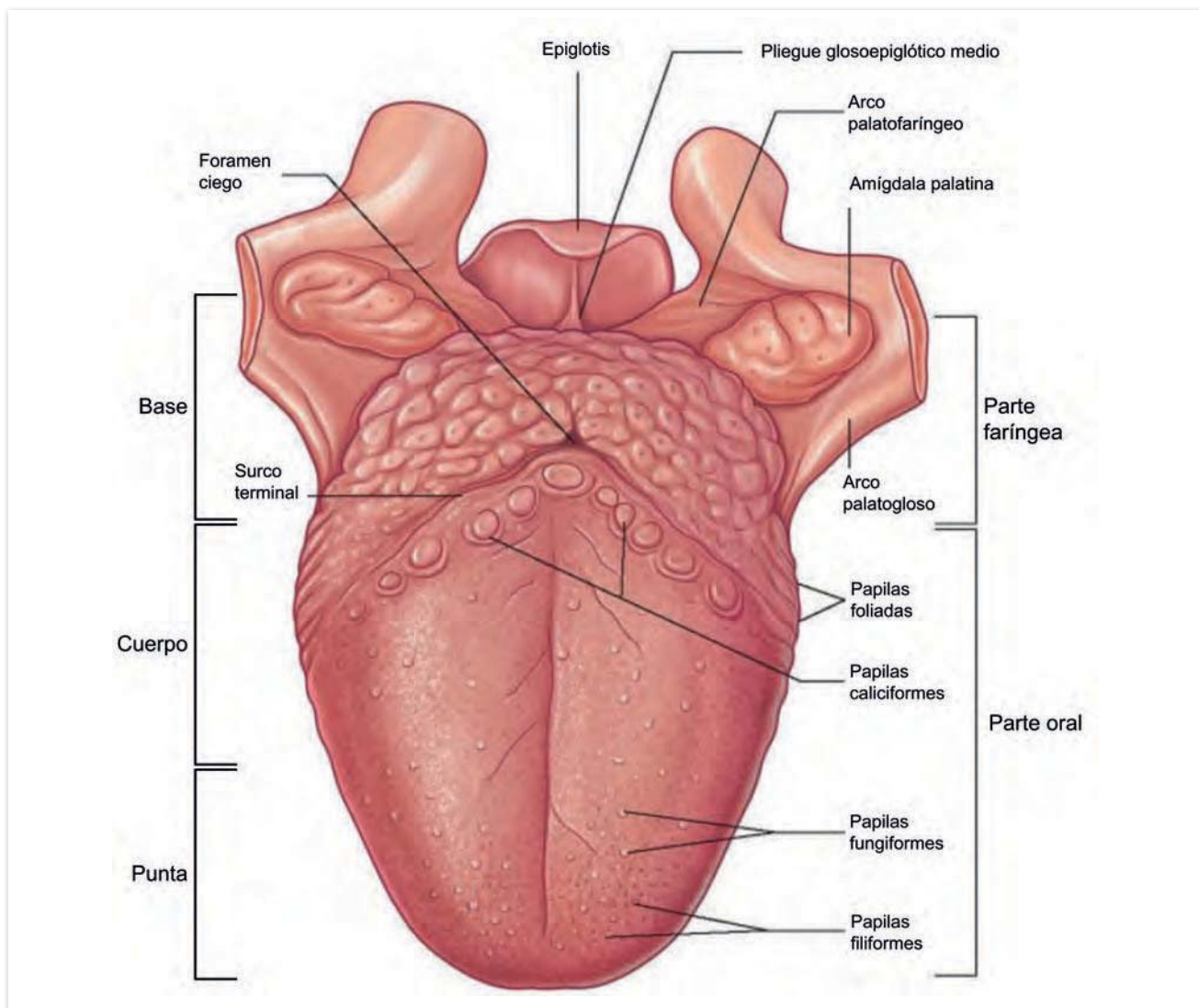


Figura 2. Anatomía de la lengua. Imagen adaptada de Standring et al (2008) (1).

- Lengua:** órgano muscular situado en la parte media del suelo de la boca, formado por músculos estriados de tipo hidrostático orientados en distintas direcciones y recubierto en su parte dorsal por una mucosa especializada que contiene los botones gustativos. La lengua está formada por tres partes: la base o raíz, el cuerpo y la punta; la base es el tercio de la lengua posterior el surco terminal o V lingual, el cuerpo es el tercio central de la lengua y la punta es el tercio anterior al frenillo de la lengua. La lengua se une, a través de la base, al paladar blando por los arcos palatoglosos y a la epiglotis por los pliegues glosopigloticos formando la vallécula (**Figura 2**). Los músculos que forman la lengua pueden dividirse entre extrínsecos o intrínsecos en función de si están unidos o no a algún hueso (mandíbula, hueso hioides o apófisis estiloides) y funcionan como un sistema hidráulico. La contracción y relajación de los distintos grupos de fibras musculares de la lengua permiten realizar las diferentes variantes de los movimientos de retracción, proyección y articulación (**Figura 3**). Los botones gustativos pueden encontrarse en papilas fungiformes dispersas por todo el cuerpo de la lengua, en papilas circunvaladas (entre 8 y 12) situadas en el surco terminal o en las papilas foliadas situadas en los laterales de la base de la lengua. Los botones gustativos perciben los cinco sabores básicos: dulce, salado, ácido, amargo y el sabor producido por el glutamato y los ribonucleótidos IMP y GMP de los alimentos, conocido como *umami* (1,2).

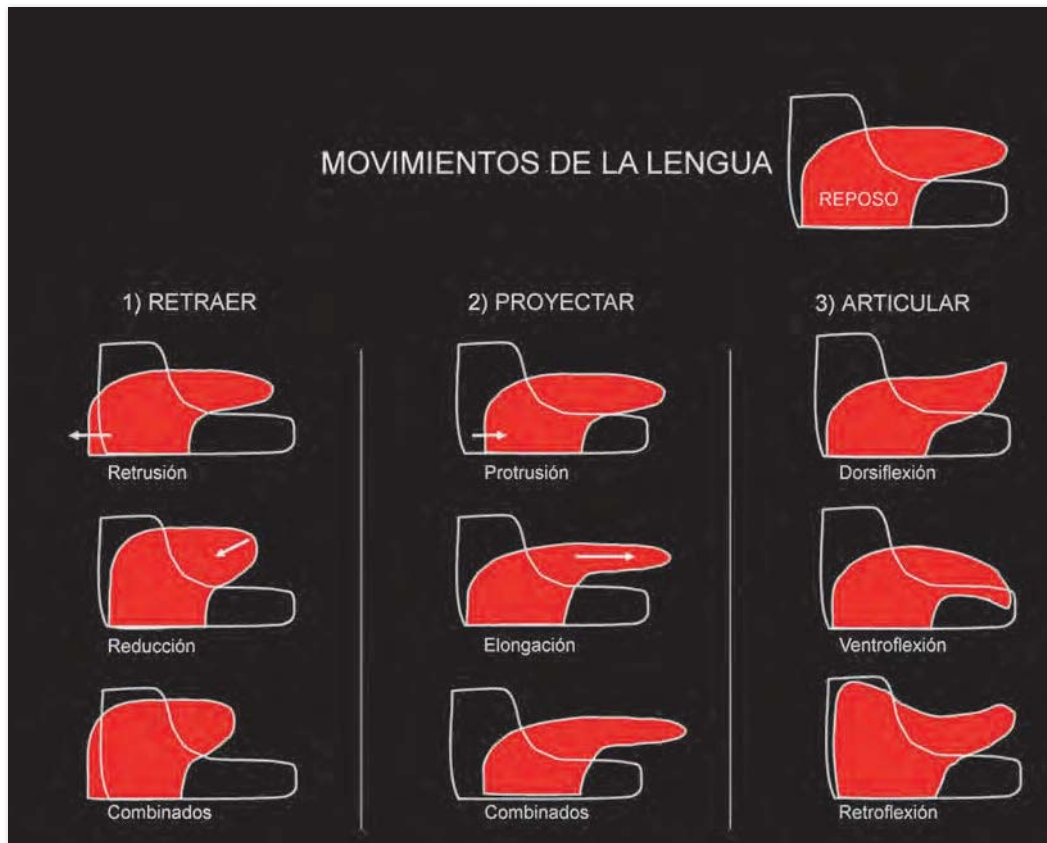


Figura 3. Movimientos de la lengua. Imagen adaptada de Sanders et al (2013) (2).

1.2. Faringe

Es la estructura que forma la segunda sección del tubo digestivo. Empieza detrás de las fosas nasales y la boca y termina en la laringe y el esófago. Fisiológicamente realiza funciones propias tanto del sistema digestivo como del respiratorio. Anatómicamente se divide en 3 partes (**Figura 4**):

- **Nasofaringe:** es la sección superior de la faringe conectada a la parte posterior de las fosas nasales a través de las coanas y que limita por encima del paladar blando con la orofaringe por el istmo de la faringe. Su función principal es respiratoria y fonadora. Durante la deglución, el velo palatino se levanta y contacta con la pared posterior de la faringe formando el sello velofaríngeo que separa la orofaringe y la nasofaringe evitando así la regurgitación nasal del bolo.
- **Orofaringe:** es la sección intermedia de la faringe que limita en la parte superior con el istmo de la faringe y en la parte inferior con el plano formado por el hueso hioides. Se comunica con la cavidad oral a través del istmo de las fauces. Su superficie está cubierta por una mucosa de recubrimiento. Su función principal es la alimentación y la respiración, permitiendo el paso de alimento a través de los canales alimentarios hacia la vía digestiva y de aire a través de la laringe hacia la vía respiratoria.
- **Laringofaringe:** es la sección baja de la faringe, también conocida como hipofaringe, que limita por la parte superior con el hueso hioides y por la parte inferior con el cartílago cricoides, a la altura de la sexta vértebra cervical. En el plano coronal se sitúa tras la laringe, en paralelo, y presenta forma de embudo. Su pared anterior contiene el orificio laríngeo de forma romboide o elíptica, con la epiglotis en su parte superior y los pliegues aritenopiglóticos en la parte inferior; debajo se encuentra el seno piriforme, continuación de los canales alimentarios de la lengua. Las paredes de la laringofaringe están formadas por tres capas: la capa que da al lumen es una mucosa de recubrimiento, hay una capa muscular intermedia con músculos de contracción lenta que participan en los procesos de respira-

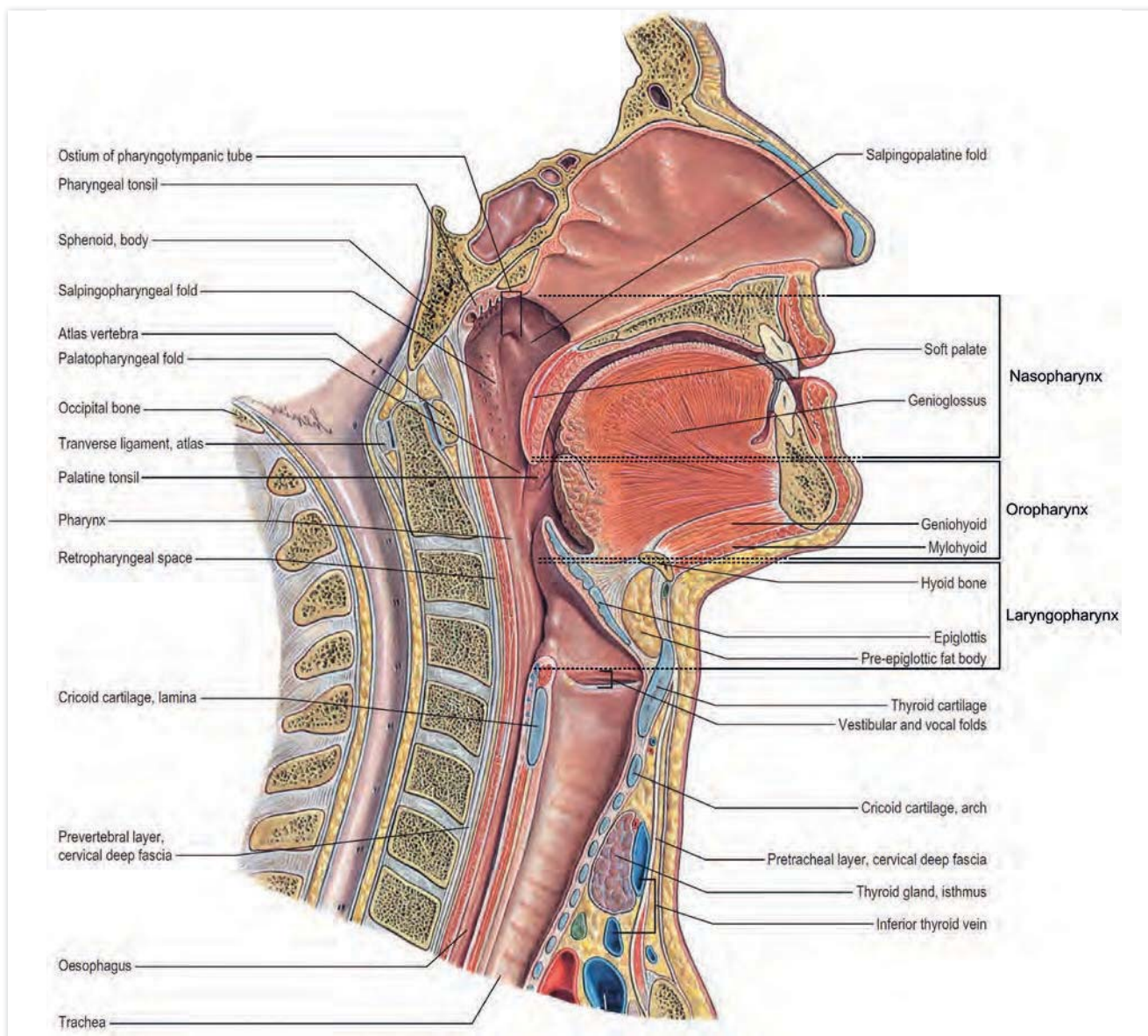


Figura 4. Anatomía de la faringe. Imagen adaptada de Standring et al (2008) (4).

ción y fonación, y una capa muscular más externa con músculos de contracción rápida que participa en los procesos de deglución. Esta última capa muscular está formada por distintos grupos de músculos que estrechan la faringe al paso del bolo provocando movimientos peristálticos y elevan y acortan la faringe durante la deglución (3,4).

1.3. Laringe

Es la estructura anatómica que forma parte de la vía respiratoria y contiene, además, el órgano de la fonación. Situada en el plano coronal por delante de la laringofaringe, entre la orofaringe y la tráquea. Está formada por un esqueleto cartilaginoso, articulaciones y ligamentos que unen los cartílagos, los músculos que los movilizan y está cubierta por una mucosa respiratoria. Los principales cartílagos que la forman son el tiroides, el cricoides por debajo, los aritenoides que son dos y reposan sobre el borde superior del cricoides y la epiglotis, con una superficie de cara al tracto digestivo (cara lingual) cubierta por mucosa de recubrimiento delimitando las valléculas y otra superficie de cara al tracto respiratorio (cara laríngea) cubierta por mucosa respiratoria. Durante la deglución, la epiglotis se mueve para cerrar la entrada a la vía aérea gracias a la contracción del músculo ariepiglótico, la presión de la base de la

lengua y el desplazamiento del hueso hioides hacia arriba y hacia delante; de esta manera la epiglotis desvía el bolo hacia la laringofaringe, evitando que llegue a vía respiratoria y provoque complicaciones respiratorias.

Internamente la laringe se puede dividir en 3 partes (**Figura 5**):

- **Vestíbulo laríngeo (VL):** espacio que constituye la entrada de la laringe y acaba en los pliegues vestibulares o cuerdas vocales falsas.
- **Ventrículo laríngeo:** espacio limitado superiormente por los pliegues vestibulares e inferiormente por las cuerdas vocales verdaderas o pliegues vocales.
- **Cavidad infraglotica:** espacio que va desde los pliegues vocales hasta la tráquea (5).

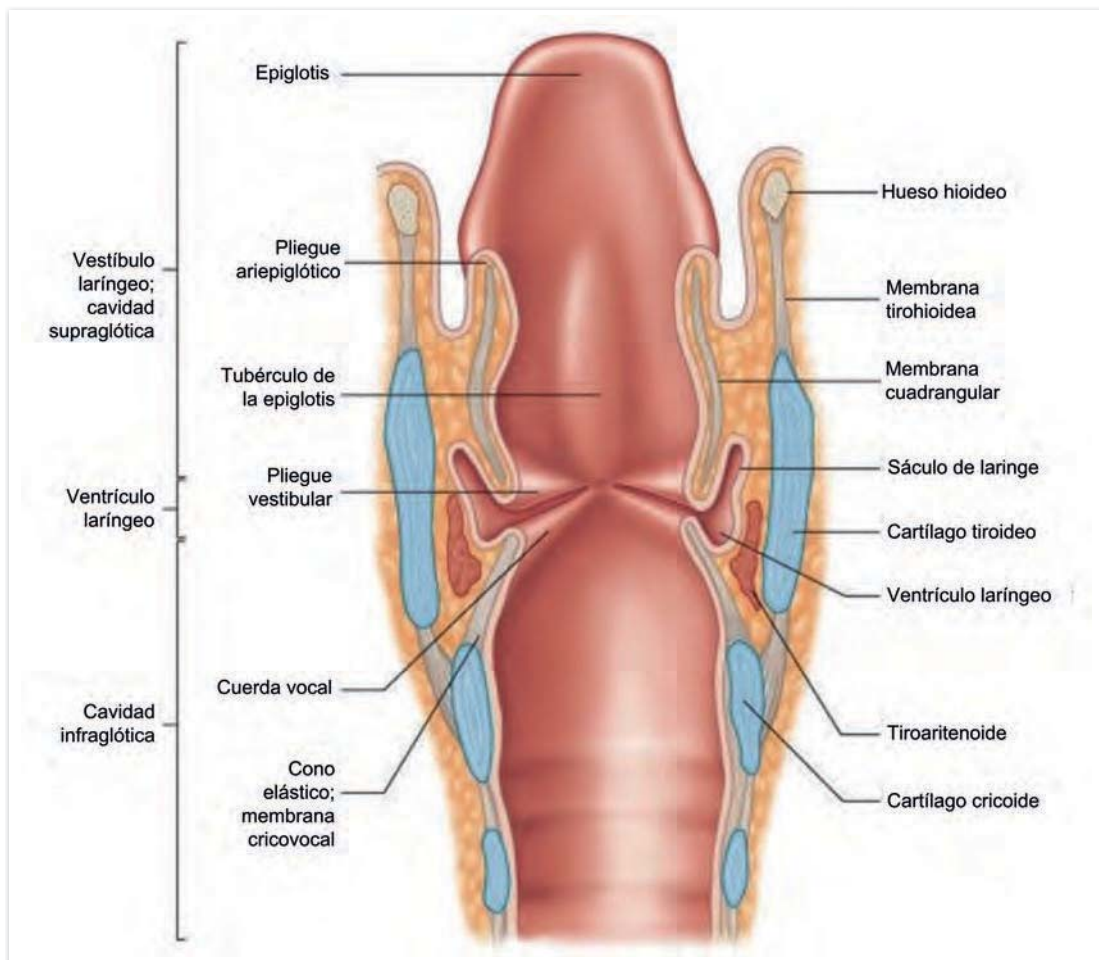


Figura 5. Anatomía de la laringe. Imagen adaptada de Standing et al (2008) (5).

1.4. Esófago

Estructura del tubo digestivo que comunica la faringe y el estómago. Está formado por una capa de músculo liso y estriado cubierto de mucosa. Los primeros 5-7 centímetros de esófago están formados de forma íntegra por músculo estriado de activación involuntaria y a medida que se avanza hacia el estómago la proporción de músculo liso aumenta hasta llegar a ser el único tipo muscular que forma el esófago más distal. El esófago tiene dos válvulas bien diferenciadas:

- **Esfínter esofágico superior (EES):** zona de alta presión que separa la faringe y el esófago. Situado a la altura de la quinta o sexta vértebra cervical, mide de 2 a 4cm de longitud. Formado por el músculo cricofaríngeo, la parte inferior del músculo constrictor faríngeo y la parte superior del músculo del

esófago cervical. Está cerrado tónicamente para impedir la entrada de aire al tracto digestivo o el reflujo del esófago a la faringe. Se abre para permitir la entrada del bolo o la salida de vómito y aire.

- **Esfínter esofágico inferior:** constituido por músculo liso, aún y no existir una estructura anatómica de esfínter, fisiológicamente ejerce dicha función. Tiene una presión basal en reposo que se relaja cuando se produce una onda peristáltica en el cuerpo esofágico, cuando hay distensión esofágica al paso del bolo y con distensión gástrica (6,7).

2. Innervación sensorial orofaríngea

(Ver anexo 1)

2.1. Anatomía de la innervación sensorial orofaríngea

La cavidad oral y la faringe humana están inervadas por las fibras aferentes de las ramas linguales de los nervios trigémino (par craneal V) y glosofaríngeo (par craneal IX) y algunas fibras aferentes de la *chorda tympani* del nervio facial (par craneal VII), las ramas faríngeas de los nervios glosofaríngeo y vago (par craneal X), y la rama laríngea del nervio vago (**Figura 6**).

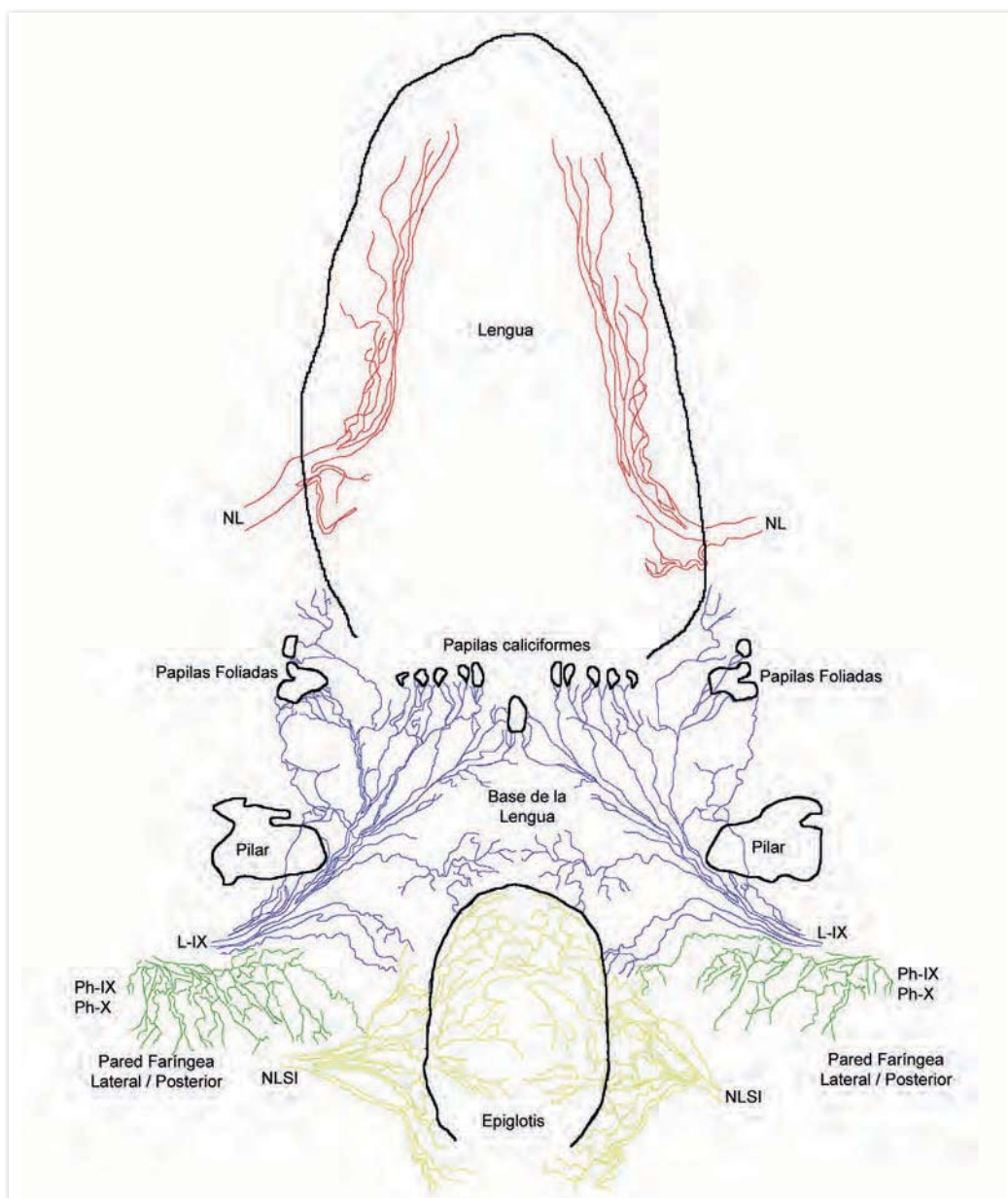
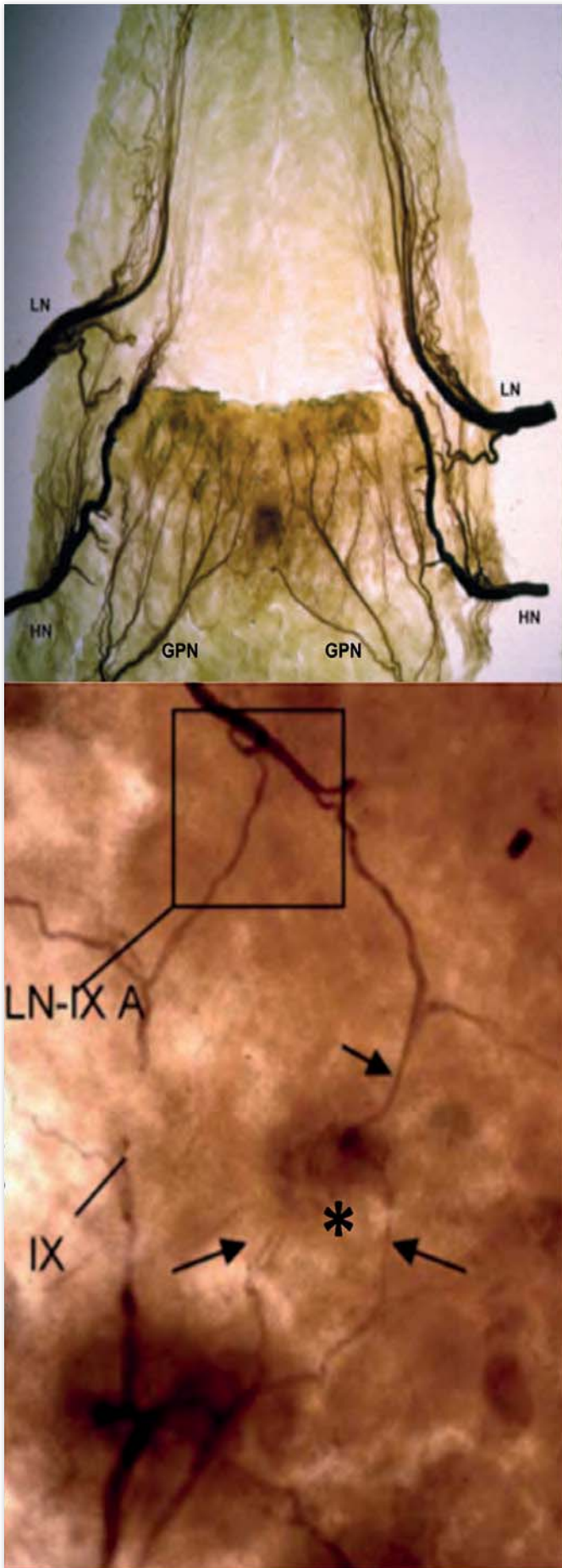
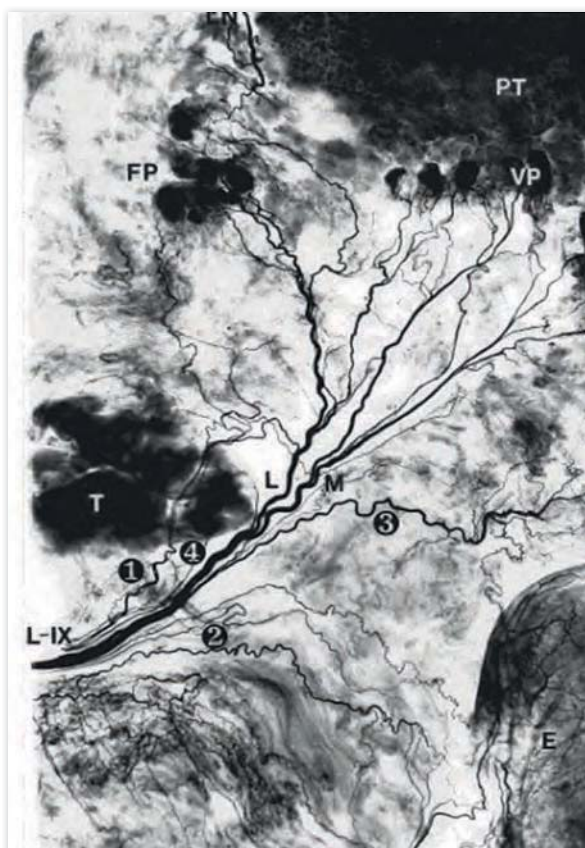
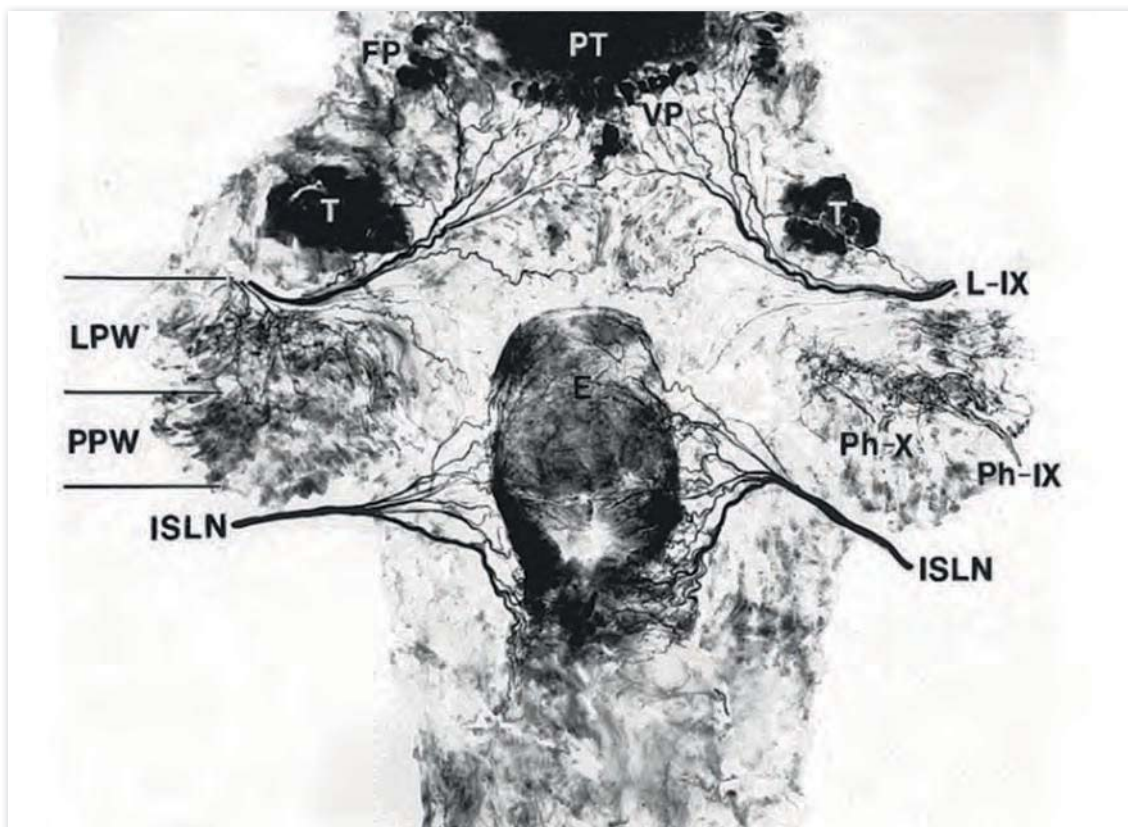


Figura 6. Esquema de la innervación de la orofaringe. Nervio lingual (NL) en rojo, rama lingual del glosofaríngeo (L-IX) en azul, plexo faríngeo (Ph-IX y Ph-X) en verde, nervio laríngeo superior interno (NLSI) en amarillo. Imagen adaptada de Alvarez-Berdugo et al (2016) (74).



- **Inervación de la lengua:** La lengua está inervada por las fibras aferentes de las ramas linguales de los nervios trigémino, facial y glosofaríngeo (L-IX). La base de la lengua y las papilas están inervadas por dos de las cuatro subdivisiones principales de la L-IX. La subdivisión de la L-IX que inerva la mucosa de la base de la lengua se divide en ramas terciarias y pequeñas ramificaciones que se extienden hacia el eje central de la lengua, donde se unen a las ramificaciones procedentes del lado contrario. La subdivisión de la L-IX que inerva las papilas se divide en ramas laterales y mediales; mientras las ramas laterales inervan las papilas foliadas y las papilas caliciformes de los laterales, las ramas mediales inervan la mayoría de las papilas caliciformes de forma ipsilateral. La papila caliciforme central está inervada por ramas mediales de las L-IX de ambos lados (8). El cuerpo y la punta de la lengua están inervados por el nervio lingual (NL), formado por la rama lingual del trigémino y algunas fibras sensoriales de la chorda tympani. El NL penetra en la lengua anterior al surco terminal y se subdivide en ramas mediales y laterales; las ramas mediales inervan la mucosa ventrolateral de la lengua, mientras que las ramas laterales inervan los laterales de la lengua y su punta. Las fibras aferentes del NL, tanto de la rama lateral como de la medial, forman anastomosis con fibras eferentes del nervio hipogloso que circula por el centro de la lengua (9). Las fibras aferentes del NL también forman anastomosis con las fibras sensoriales de la L-IX del borde anterior de la base de la lengua (10) (**Figura 7**).

Figura 7. Lengua humana con tinción de Sihler (arriba). LN = nervio lingual, HN = nervio hipogloso, GPN = nervio glosofaríngeo. Imagen adaptada de Zur et al (2004) (9).
Detalle de la anastomosis entre los nervios lingual y glosofaríngeo (LN-IX A) (abajo). También se puede observar como el NC IX (flechas larga) y el nervio lingual (flecha corta) inervan una misma papila caliciforme (*). Imagen adaptada de Doty et al (2009) (10).

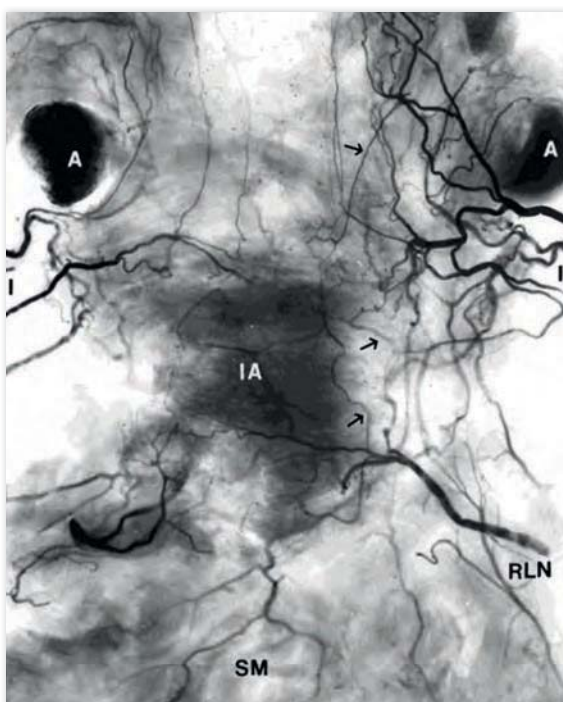


- Inervación de la orofaringe:** la mucosa orofaríngea está inervada por las ramas linguales (L-IX) y faríngeas (Ph-IX) del nervio glosofaríngeo y por la rama faríngea del nervio vago (Ph-X). La mucosa amigdalina y periamigdalina y la cara lingual de la epiglotis están inervados por dos de las cuatro subdivisiones principales de la L-IX. La subdivisión de la L-IX que inerva las amígdalas y el área periamigdalina se divide en dos o tres ramas terciarias que rodean la amígdala. La subdivisión de la L-IX que inerva la epiglotis también se subdivide en dos o tres ramas terciarias; una de ellas inerva la mucosa de la cara lingual de la epiglotis y las otras forman anastomosis con la rama superior del nervio laríngeo superior interno (NLSI). Las paredes laterales y posterior de la faringe, incluyendo los pilares palatofaríngeos o posteriores, están inervadas por las tres subdivisiones de la Ph-IX junto a las fibras sensoriales de la Ph-X; estos dos grupos de fibras sensoriales forman un denso plexo nervioso en la mucosa de esta región (8) (**Figura 8**).

Figuras 8. Preparación con tinción de Sihler para observar la inervación de la mucosa orofaríngea (arriba). La mucosa de la pared faríngea posterior (PPW) ha sido cortada por la mitad. ISLN = nervio laríngeo superior interno, E = epiglotis, PT = lengua posterior, T = pilar amigdalina, VP = papilas calciformes, FP = papilas foliadas, LPW = pared faríngea lateral.

Detalle de la inervación de la rama lingual del NC IX (abajo). El L-IX se divide en cuatro ramas: amigdalina (1), epiglótica (2), base de la lengua (3), y papilar (4). La rama papilar se subdivide en las ramas media (M) y lateral (L).

- **Inervación de la laringe y la hipofaringe:** la mucosa hipofaríngea está inervada por la rama laríngea del nervio vago, el NLSI. El NLSI penetra la membrana tirohioidea y se subdivide en tres ramas. La cara laríngea de la epiglotis está inervada por la rama superior del NLSI, que penetra la epiglotis por ambos lados a través del pliegue ariepiglótico y se subdivide en pequeñas ramificaciones que forman una densa red con las ramificaciones que llegan de ambos lados. El pliegue ariepiglótico, el vestíbulo laríngeo y las cuerdas vocales están inervados por la rama media del NLSI que se subdivide para formar una red de pequeñas ramificaciones interconectadas bajo la mucosa. El resto de la hipofaringe está inervada por la rama inferior del NLSI, la de mayor diámetro y con una distribución más compleja: inerva los cartílagos aritenoides con sus subdivisiones superiores, inerva la región posterior de los aritenoides y los músculos interaritenoides con sus subdivisiones intermedias, e inerva la mucosa de la pared anterior de la hipofaringe con sus subdivisiones inferiores (11,12) (**Figura 9**).



Figuras 9. Preparación con tinción de Sihler para observar la distribución del nervio laríngeo superior interno (NLSI) (arriba). E = epiglotis, S = rama superior del NLSI, M = rama media del NLSI, I = rama inferior del NLSI.

Detalle de la distribución de la rama inferior del NLSI (izquierda). PG = pared posterior de la glotis, A = aritenoides, IA = músculo interaritenoides, RLN = nervio laríngeo recurrente, SM = mucosa subglótica.

Imágenes reproducidas de Sanders y Mu (1998) (12).

2.2. Histología de la mucosa orofaríngea

Las estructuras de la cavidad oral, la orofaringe y la hipofaringe están cubiertas, según su función, por tres tipos de mucosa (**Figura 10**):

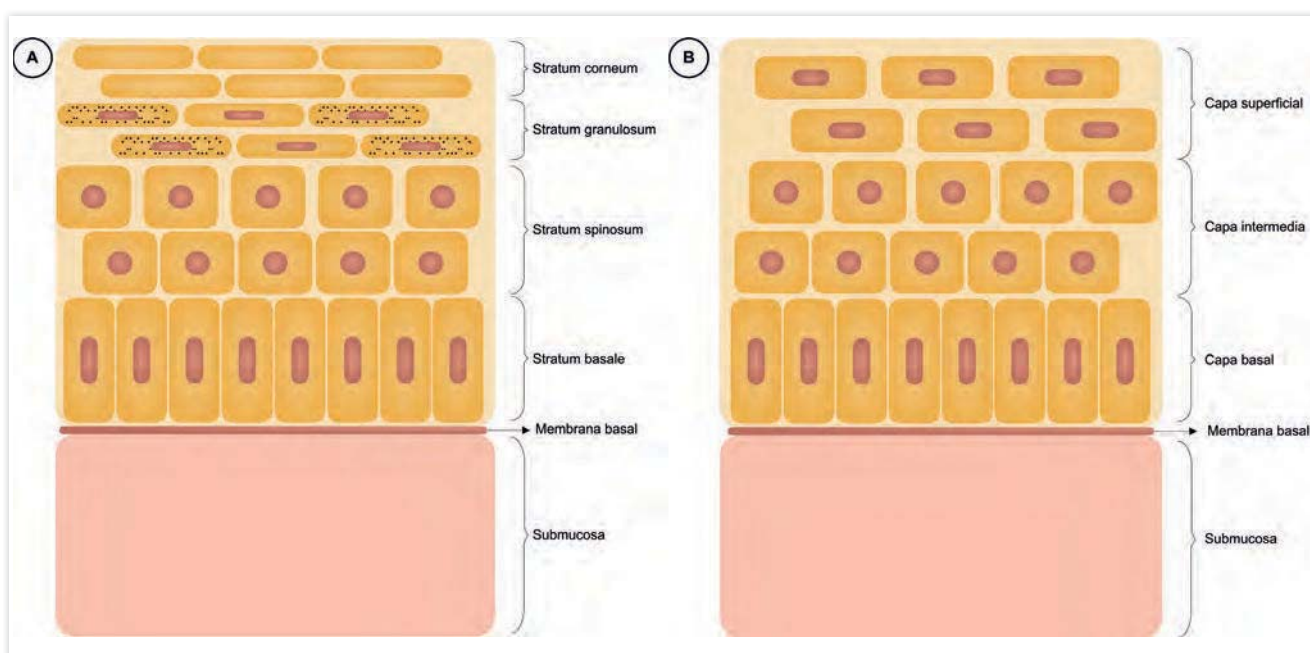


Figura 10. Estructura de la mucosa orofaríngea. Representación esquemática de los dos tipos de epitelio que cubren la orofaringe. (A) Epitelio paraqueratinizado (B) Epitelio no queratinizado. Imagen adaptada de Alvarez-Berdugo et al (2016) (74).

- **Mucosa masticatoria:** cubierta por un epitelio estratificado paraqueratinizado y con una submucosa muy fina, recubre estructuras duras que soportan elevadas fuerzas de tensión y estiramiento, como las encías o el paladar duro.
- **Mucosa de recubrimiento:** cubierta por un epitelio estratificado no queratinizado y con una submucosa gruesa, a veces dividida por una lámina propia, este tipo de mucosa recubre el resto de estructuras del tubo digestivo en orofaringe y cavidad oral, a excepción de la lengua y el paladar blando.
- **Mucosa especializada:** recubre el dorso y laterales de la lengua y el paladar blando. Contiene papilas filiformes cubiertas por epitelio estratificado paraqueratinizado y papilas fungiformes, caliciformes y foliadas cubiertas por epitelio estratificado no queratinizado; esas estructuras cubiertas por epitelio no queratinizado están especializadas en la percepción del gusto a través de los botones gustativos.

En todos estos tipos de mucosa, la submucosa está formada por tejido conectivo que contiene en sus capas más profundas las fibras nerviosas y los vasos sanguíneos más gruesos. Las fibras nerviosas más finas viajan a las capas más superficiales formando asas capilares y filamentos nerviosos que inervan los elementos papilares de la mucosa, alcanzando la lámina basal y atravesándola en algunos casos (13,14).

2.3. Estructuras especializadas de la inervación sensorial orofaríngea

Los nervios sensoriales de la mucosa orofaríngea perciben principalmente estímulos químicos (gusto y sustancias pungentes), térmicos y mecánicos. El gusto es percibido a través de las fibras de la *chorda tympani* del par craneal VII que viajan en el nervio lingual por los dos tercios anteriores de la lengua y a través de las fibras de la rama lingual del glossofaríngeo que inervan las papilas caliciformes y foliadas del surco terminal y la base de la lengua respectivamente. Los estímulos mecánicos, térmicos, químicos (no

gustativos) y dolorosos se perciben en la cavidad oral y la orofaringe a través de las ramas correspondientes de los pares craneales V, IX y X. La percepción de todos estos estímulos se realiza a través de las siguientes estructuras especializadas que se encuentran en la mucosa (**Figura 11**):

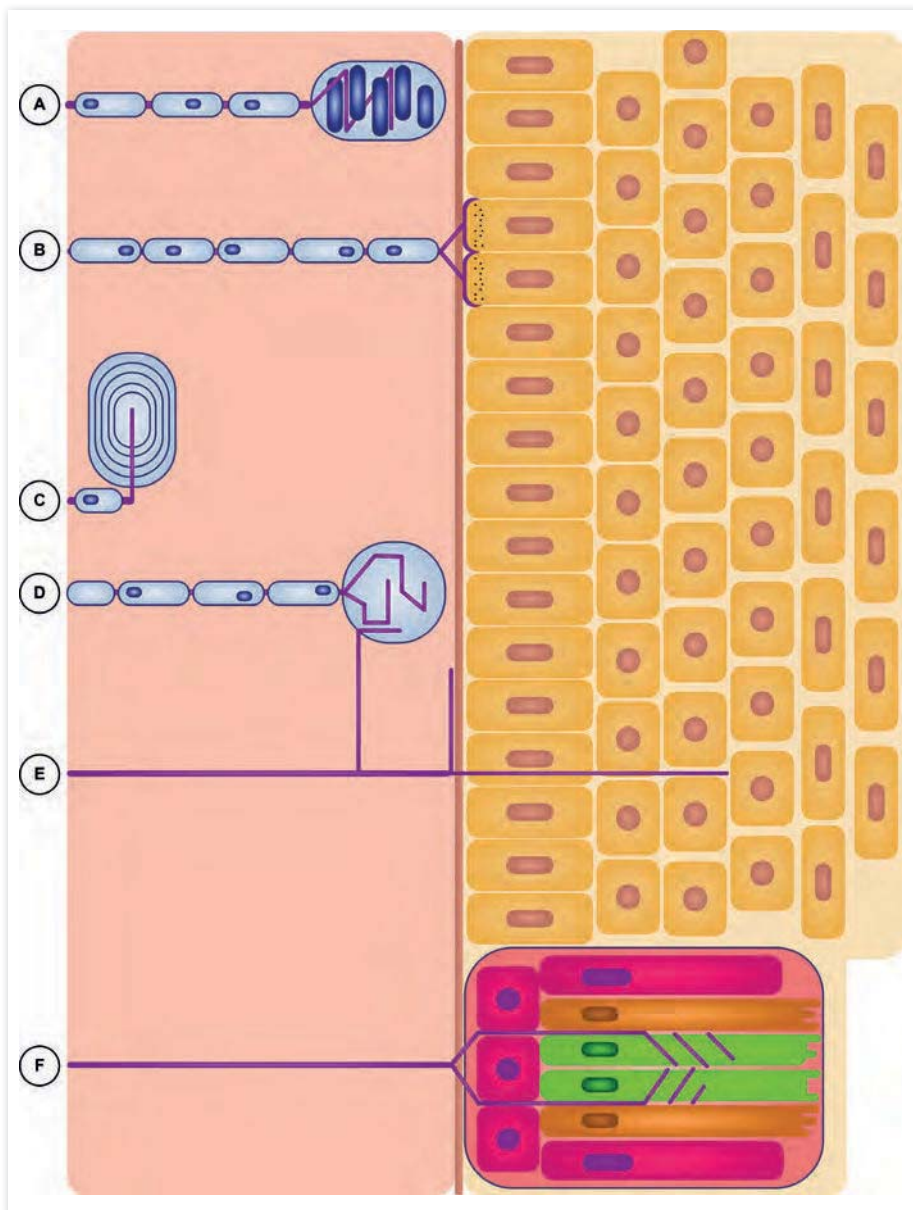


Figura 11. Estructuras sensoriales de la orofaringe. A) Corpúsculo de Meissner. B) Células de Merkel. C) Corpúsculo de Pacini. D) Corpúsculo de Krause. E) Terminal libre. F) Botón gustativo. Imagen reproducida de Alvarez-Berdugo et al (2016) (74).

- **Botones gustativos:** son las estructuras que permiten distinguir los cinco sabores básicos que conforman el sentido del gusto: salado, dulce, ácido, amargo y umami. Se encuentran sobre las papilas fungiformes de los dos tercios anteriores de la lengua y del paladar blando y en los pliegues de las papilas caliciformes y sobre las papilas foliadas de la base de la lengua. Los botones gustativos de las papilas fungiformes están inervados por las fibras sensoriales del nervio facial contenidas en el nervio lingual. Los botones gustativos de las papilas caliciformes y foliadas están inervadas por las fibras sensoriales de la rama lingual del nervio glossofaríngeo. Los botones gustativos son estructuras con forma de bulbo formadas por células epiteliales especializadas (15,16); estas células fueron clasificadas inicialmente como tipo I, II y III en función de su morfología (17), pero más tarde se identificó una función específica para cada uno de estos tipos celulares. Las células de tipo I son las más abundantes (50-75% del botón) y dan soporte celular al resto de tipos celulares (18); además se sospecha que están implicadas en la transduc-

ción del sabor salado (19). Las células de tipo II están implicadas en la transducción de los sabores umami, dulce y amargo, en función del receptor especializado que expresen (20,21). Las células tipo III establecen unión sináptica con los terminales nerviosos que inervan el botón gustativo (22) y están implicadas en la transducción del sabor ácido y salado (21). Todas estas células están comunicadas, de manera que las células tipo I dan soporte a las funciones de percepción y comunicación sináptica de las células tipo II y III; las células de tipo II son las que perciben los gustos de forma fina y transmiten la señal a las células de tipo III, que finalmente transmitirán la información del estímulo al terminal nervioso (18). El terminal nervioso, independientemente de qué par craneal provenga, penetra la lámina basal del epitelio y se ramifica en diversas extensiones que envuelven las células tipo III, formando así una sinapsis (22,23).

- **Corpúsculos de Meissner:** son estructuras que permiten percibir estímulos mecánicos suaves sin componente doloroso. Se encuentran agrupados dentro de las papilas, dispuestos en distintas direcciones; la intensidad del estímulo que perciban dependerá de la orientación de cada corpúsculo respecto al estímulo mecánico. Están inervados por grupos de una a tres fibras nerviosas mielinizadas que pierden su vaina de mielina tras entrar al corpúsculo y pueden formar ramificaciones o presentar forma discoide dentro del corpúsculo. Los terminales axonales se encuentran envueltos por varias capas de lamellas separadas por interespacios de fibras de colágeno y emiten proyecciones citoplasmáticas que atraviesan las lamellas más internas para contactar con las fibras de colágeno. Los corpúsculos están recubiertos por una cápsula de colágeno que los mantiene separados de la lámina basal del epitelio (24–26) (**Figura 12.A**).
- **Corpúsculos de Pacini:** son estructuras que permiten percibir estímulos mecánicos profundos sin componente doloroso. Se encuentran en la zona profunda de la submucosa. Están inervados por una única fibra nerviosa mielinizada que recorre el corpúsculo en línea recta. Los corpúsculos de Pacini son estructuras lamelares (27,28).
- **Células de Merkel:** son estructuras que permiten percibir los estímulos mecánicos más suaves sin componente doloroso. Se encuentran solas o en grupo en la capa basal del epitelio, siempre unidas a la lámina basal. Están inervadas por terminales axonales que penetran la lámina basal tras perder su vaina de mielina; cada célula de Merkel tiene su extremo basal recubierto por un terminal nervioso en forma de menisco. Las células de Merkel presentan gránulos en su extremo basilar y en su extremo apical emiten protuberancias citoplasmáticas que contactan con las células epiteliales contiguas (29–32) (**Figura 12.D**).
- **Corpúsculos de Krause:** también conocidos como corpúsculos bulboides, son estructuras que permiten percibir tacto ligero y estímulos fríos. Se encuentran en el espacio papilar y están inervados por grupos de una a tres fibras nerviosas mielinizadas o no mielinizadas; en caso que fibras de ambos tipos penetren un mismo corpúsculo, éstas nunca entran en contacto. Las fibras mielinizadas pierden su vaina de mielina antes de entrar al corpúsculo y lo recorren en forma de espiral mientras se ramifican en diversos terminales axonales. Los corpúsculos de Krause son estructuras bulboides recubiertas por una cápsula formada por una capa de fibroblastos y fibras de colágeno (33,34) (**Figura 12.B**).
- **Terminaciones libres:** estructuras que perciben dolor y estímulos químicos y térmicos. Se ramifican y alcanzan la lámina basal del epitelio, donde forman varicosidades justo bajo la lámina basal; estas varicosidades están cubiertas por células de Schwann que están estrechamente unidas a la lámina basal y, en algunos casos, la lámina basal y las células de Schwann se vuelven más finas y permiten que el terminal axonal penetre el epitelio para llegar a capas más superficiales. Aún y así, las fibras nerviosas intraepiteliales son poco frecuentes en la mucosa orofaríngea. Generalmente formadas por fibras nerviosas de tipo A δ y C (32,35,36) (**Figura 12.C**).

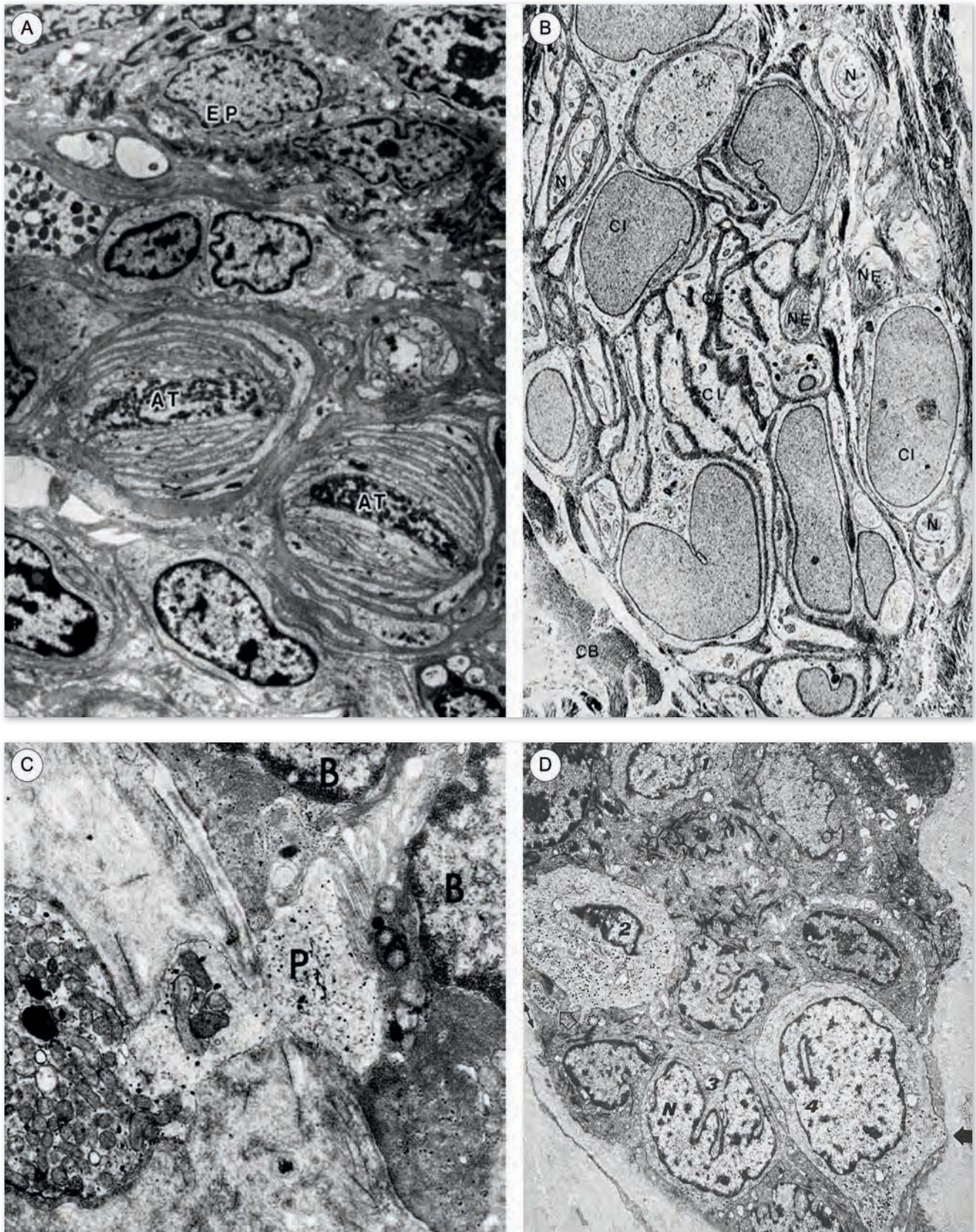


Figura 12. Microfotografías obtenidas con microscopio electrónico de transmisión de las estructuras sensoriales de la orofaringe. A) Corpúsculos de Meissner en papilas fungiformes de mono x3000; imagen reproducida de Toyoshima et al (1987) (31). B) Corpúsculo de Krause en mucosa oral humana x10000; imagen reproducida de Chouchkov (1973) (33). C) Terminales libres en contacto con la lámina basal en mucosa de epiglotis humana x15000; imagen reproducida de Chiba et al (1985) (36). D) Células de Merkel en mucosa de encía humana x3250; imagen reproducida de Hashimoto (1972) (30).

3. Fisiología de la deglución

3.1. Respuesta Motora Orofaríngea (RMO)

Las estructuras del tracto aerodigestivo superior tienen dos funciones fisiológicas básicas: la respiración y la deglución. Los movimientos coordinados que permiten reconfigurar estas estructuras de la orofaringe durante la deglución para proteger la vía respiratoria y configurar una vía digestiva se denomina respuesta motora orofaríngea (RMO), y tienen como objetivo permitir la transferencia del bolo de la boca al esófago de forma segura y eficaz y recuperar de nuevo la vía respiratoria (37–39) (**Figura 13**). Este proceso complejo puede dividirse en tres fase secuenciales(40):

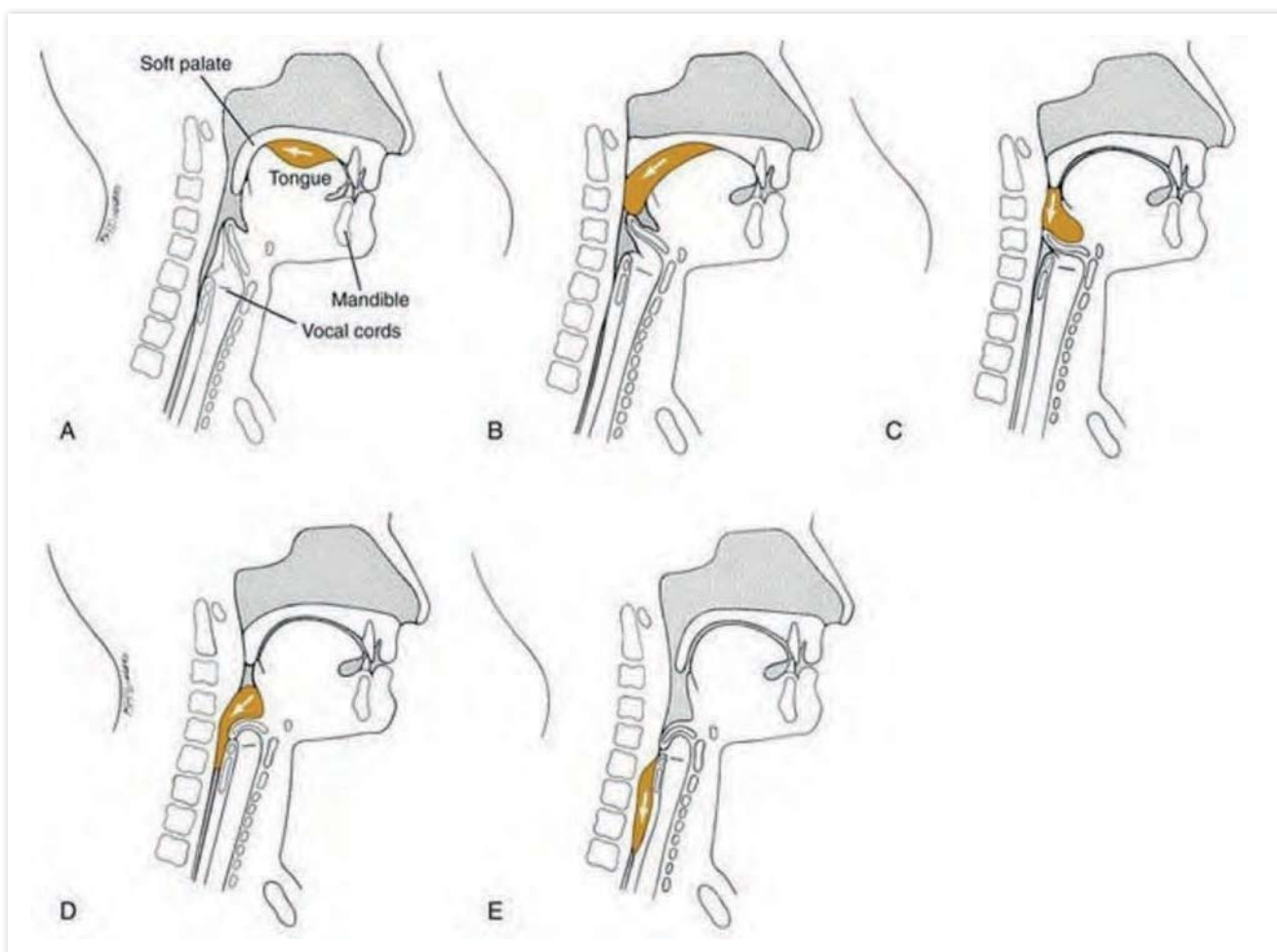


Figura 13. Vistas laterales de la cabeza y el cuello mostrando la progresión del bolo por la cavidad oral y la faringe. Imagen reproducida de Logemann (2010) (39).

- **Fase oral:** se puede dividir en dos subfases, la preparatoria y la propulsora. La fase oral preparatoria es totalmente voluntaria y tiene como objetivo principal la formación del bolo a través de acciones voluntarias como la masticación; durante esta fase, la mandíbula y la parte anterior de la lengua descienden y se abren los labios permitiendo la introducción del alimento en la cavidad oral, posteriormente, mediante la masticación los sólidos son disgregados y molidos. La masticación se caracteriza por movimientos cíclicos de la mandíbula que se sincronizan con el transporte del alimento por la lengua y los carrillos hacia los molares. Durante esta subfase la parte posterior de la lengua está en

contacto con el paladar blando formando así el sello glosopalatino que evita que el bolo caiga a la orofaringe. La saliva juega un papel clave durante este proceso gracias a su capacidad de hidratar y lubricar, y a la enzima α -amilasa que inicia la digestión del alimento formando así el bolo alimenticio (41). La fase oral propulsora es también voluntaria y su objetivo principal es propulsar el bolo con la lengua a la orofaringe; durante esta fase la parte anterior de la lengua presiona contra el paladar duro para colocar el bolo en la parte posterior de la cavidad oral, al mismo tiempo, los bordes de la lengua se elevan para impedir que el bolo se deslice por los laterales de la cavidad oral. De esta forma el bolo se mueve en dirección antero-posterior hacia la orofaringe mientras se eleva el paladar blando para abrir el sello glosopalatino y cerrar la nasofaringe. Una vez el bolo llega a la orofaringe se vuelve a cerrar el sello glosopalatino para evitar que el alimento vuelva a la cavidad oral (40).

- **Fase faríngea:** se produce tras la fase oral y es totalmente involuntaria; incluye la RMO. Comienza con la entrada del bolo en la faringe y finaliza cuando el bolo sale por el esfínter esofágico superior. Se inicia por la estimulación de las aferencias faríngeas que envían información al sistema nervioso central (SNC) donde se desencadena la RMO. Los cambios provocados por la RMO tienen como objetivo reconfigurar las estructuras de la orofaringe para que pasen de ser una vía respiratoria a ser una vía digestiva que permita la transferencia del bolo de la boca al esófago y su posterior recuperación de la vía respiratoria. Estos cambios se logran gracias a la apertura y cierre coordinado del sello glosopalatino, el sello velofaríngeo, el VL y el EES (42,43). La fase faríngea se inicia con la llegada del bolo a la orofaringe, justo después del cierre del sello glosopalatino, y con el movimiento de la pared posterior de la faringe para formar el sello velofaríngeo, cerrando así la nasofaringe para evitar regurgitaciones nasales. De forma sincronizada, se produce la aducción de las cuerdas vocales y los aritenoides para cerrar la vía respiratoria. Además, los pliegues aritenoides se aproximan hasta contactar con la base de la epiglotis y se produce una retroflexión de la epiglotis a causa de la presión pasiva de la base de la lengua y la contracción activa de los músculos ariepiglóticos que acaban de cerrar el VL evitando que el alimento pueda llegar a la laringe. También el hioides y la laringe se mueven anteriormente y hacia arriba gracias a los músculos suprahioides y longitudinales de la laringe, haciendo que la entrada de la laringe se sitúe bajo la base de la lengua, evitando así la trayectoria del bolo alimentario. Todos estos movimientos contribuyen además al acortamiento y expansión del espacio hipofaríngeo y a la apertura y elevación del EES, facilitando así el paso del bolo hacia el esófago (42–44).
- **Fase esofágica:** es una fase involuntaria controlada por el sistema nervioso entérico que empieza cuando el bolo pasa por el EES y se caracteriza por la peristalsis primaria esofágica y la relajación del esfínter esofágico inferior que permite el transporte del bolo al estómago (45).

3.2. Neurofisiología de la deglución

Para llevar a cabo la RMO de forma coordinada se requiere la interacción y conexión precisa de diversas áreas y elementos del SNC y del sistema nervioso periférico. También se requiere la integridad estructural de la orofaringe y la laringe, el correcto funcionamiento de treinta pares musculares y la perfecta coordinación con el sistema respiratorio.

En la deglución intervienen los receptores periféricos que captan los estímulos sensoriales del bolo alimenticio, generando la información que viajará a través de los nervios aferentes (pares craneales V, VII, IX y X) hacia el centro de la deglución (*Central pattern generator*, CPG), situado en el núcleo del tracto solitario (NTS) del bulbo raquídeo en el tronco encefálico, y hacia las áreas somatosensoriales de la corteza correspondientes que procesarán estos estímulos. Con la participación de estructuras subcorticales

como la amígdala y los ganglios basales, se enviará información de la respuesta motora al CPG que integrarán la información sensorial y motora para coordinar, junto al cerebelo, la RMO, que se ejecutará a través de las motoneuronas de los pares craneales V, VII, IX, X, XI y XII (46) (**Figura 14**).

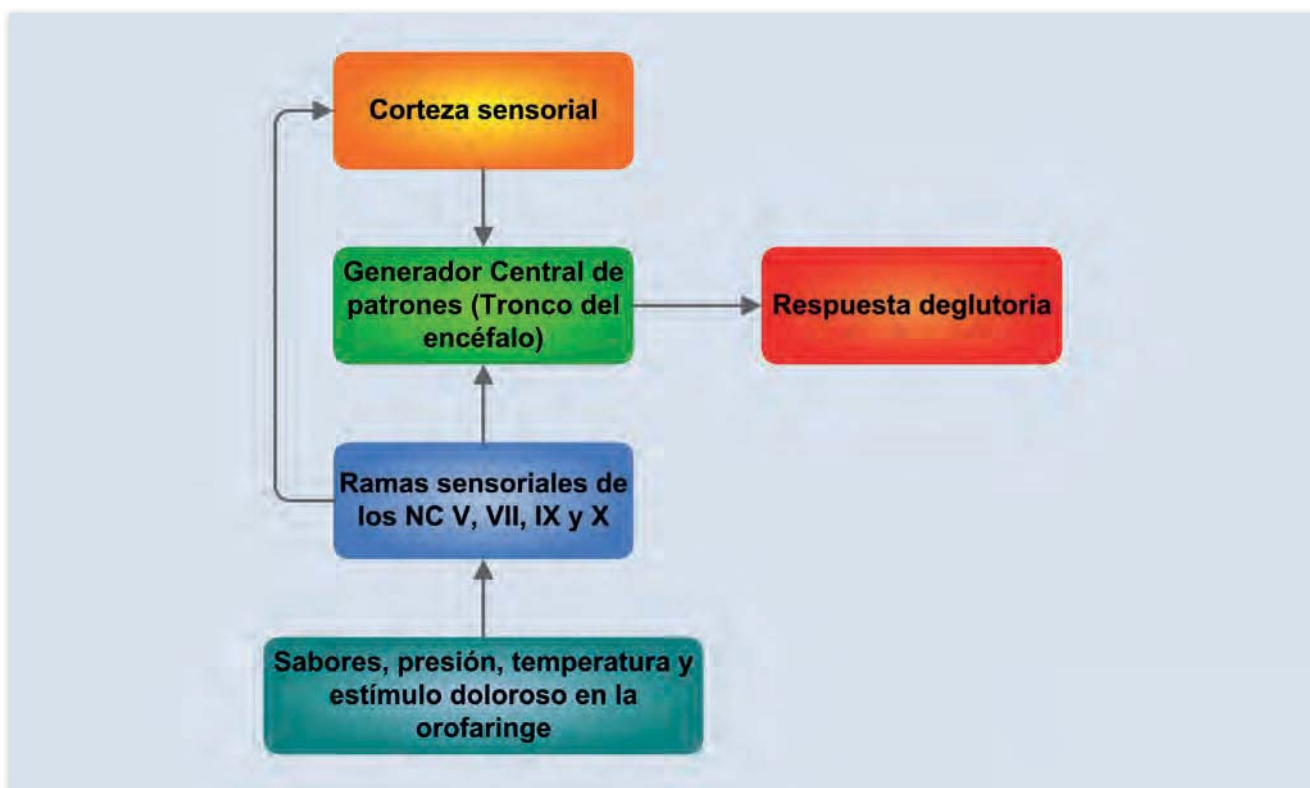


Figura 14. Vía sensorial e integración de la respuesta sensorial. Imagen adaptada de Alvarez-Berdugo et al (2016) (74).

La neuroanatomía de la deglución implica diversas áreas corticales del cerebro como el giro precentral e inferior frontal y otras regiones adyacentes a la fisura silviana y el córtex lateral y precentral, todas imprescindibles para el control voluntario de la fase oral y parte de la fase faríngea de la deglución (47). Se ha demostrado con estudios de magnetoencefalografía (MEG) y estimulación magnética transcranial (TMS) que en individuos sanos la deglución activa de forma bilateral y asimétrica diferentes áreas corticales, lo que implica la existencia de un hemisferio dominante para este proceso independiente de la mano dominante (48,49). Esta lateralización explica los diferentes grados de afectación de la deglución en pacientes con ictus unilaterales hemisféricos y las diferencias entre patrones de recuperación en la fase crónica, ya que la DO se produciría cuando el ictus afecta al hemisferio dominante para la deglución.

En el bulbo raquídeo del tronco encefálico se encuentra el CPG, que está formado por dos grupos de interneuronas bien intercomunicadas entre ellas: el *Dorsal Swallowing Group* (DSG) y el *Ventral Swallowing Group* (VSG). El DSG está situado en el NTS y presenta una respuesta sináptica de latencia muy corta y estable (1-2ms) que se corresponde a una vía de conexión monosináptica con las neuronas aferentes. El VSG está situado en la cara ventrolateral del bulbo, por encima del núcleo ambiguo y presenta una respuesta sináptica que requiere varios pulsos para iniciar la respuesta (7-12ms), sugiriendo que se trata de una vía polisináptica (38). Las neuronas del DSG integran la información procedente de la periferia y de las estructuras corticales y subcorticales para, llegados al umbral de activación, generar el patrón motor deglutorio; entonces las neuronas del DSG activan a las del VSG para que distribuyan la RMO

entre los diferentes núcleos motores (38) que controlan los músculos deglutorios. Los núcleos motores de la deglución se encuentran en la protuberancia del tronco encefálico (trigémino y facial), en el bulbo raquídeo (núcleo ambiguo e hipogloso) y en la medula espinal cervical (C1-C2). De estos núcleos surgen las motoneuronas de los pares craneales V, VII, IX, X, XI y XII y los nervios espinales cervicales altos (C1, C2 y C3) que forman el asa cervical.

Durante la fase oral y en el proceso de masticación intervienen músculos del grupo facial inervados por el par craneal VII, músculos masticatorios inervados por el par craneal V y músculos del movimiento de la lengua inervados por el par craneal XII. En la fase faríngea de la deglución intervienen los músculos suprahioides inervados por los pares craneales V, VII y XII y los infrahioides inervados por el asa cervical, también los músculos del paladar blando, faringe y laringe inervados por el plexo faríngeo formado por los pares craneales IX y X. Todos los músculos intrínsecos de la laringe están inervados por motoneuronas que tienen sus somas localizados en el núcleo ambiguo y que forman parte de la rama inferior laríngea del nervio recurrente laríngeo (par craneal X) (40).

4. Disfagia Orofaríngea

4.1. Descripción

Del griego dificultad (*dys*) al tragar (*phagia*), la DO es un síntoma que se refiere a la dificultad o molestia para formar y/o mover el bolo alimenticio de la boca al esófago y puede incluir aspiraciones traqueo-bronquiales (50). La DO está reconocida por la *International Classification of Diseases* (ICD) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un trastorno del sistema digestivo por los códigos 787.2 (ICD-9) y R13.1 (ICD-10) (51). Esta subdividida en 787.21 Disfagia, fase oral; 787.22 Disfagia, fase orofaríngea; 787.23 Disfagia, fase faríngea; 787.24 Disfagia, fase faringoesofágica; 787.29 Otra disfagia. Este código se puede completar con sufijos si la DO es secuela de un ictus (código I69.3).

4.2. Prevalencia

En el caso de la DO asociada a alteraciones neurofisiológicas de la RMO, los principales fenotipos afectados son ancianos, pacientes que han sufrido un ictus, pacientes con enfermedades neurodegenerativas, distrofias musculares y pacientes con enfermedades o secuelas de tratamientos otorrinolaringológicas. En la actualidad, la DO está generalmente infradiagnosticada y su prevalencia varía en función del método de detección utilizado (cribado o diagnóstico clínico o instrumental).

La prevalencia de DO en los pacientes ancianos varía en función del fenotipo del paciente (ancianos robustos, pre-frágiles y frágiles) y de la situación clínica del paciente (independiente en la comunidad, hospitalizado, dependiente institucionalizado en residencia geriátrica). La elevada prevalencia entre esta población se debe a dos factores principalmente: 1) al propio proceso de envejecimiento, que causa alteraciones en la fisiología deglutoria y en la RMO; y 2) la alta prevalencia de enfermedades neurológicas y neurodegenerativas que están directamente relacionadas con la edad del individuo y son por sí mismas un factor de riesgo para padecer DO (52). En pacientes ancianos de la comunidad se ha determinado una prevalencia del 11,4% - 33,7% según cuestionarios de cribado (53-57) y de un 23% mediante exploración clínica (58). En pacientes ancianos ingresados en una unidad de geriatría aguda, la prevalencia de signos clínicos de DO es del 29,4% - 47% (59,60). En pacientes institucionalizados se encontró una prevalencia del 40% con cuestionarios de cribado (61) y del 38% - 51% con métodos de diagnóstico clínico (61,62).

Respecto a las enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, la prevalencia de DO puede variar en función de la fase de la enfermedad en la que se encuentre el paciente y de la presencia de otros factores, como la edad, que puedan aumentar el riesgo de alteraciones en la deglución. La prevalencia de DO en pacientes con Alzheimer o demencia es del 57%-84% según métodos de diagnóstico instrumental (63–65); del 82% en pacientes con Parkinson evaluados instrumentalmente (66); y en pacientes que ha sufrido un ictus es del 64% - 78% en la fase aguda y del 40% - 81% en la fase crónica según métodos instrumentales (67).

4.3. Fisiopatología

Se han descrito dos tipos de alteraciones en la fisiología de la deglución en pacientes ancianos, de ictus y enfermedades neurodegenerativas: alteraciones en la biomecánica de la RMO y alteraciones en la sensibilidad orofaríngea.

Desde un punto de vista biomecánico, la deglución de una persona sana tiene una duración de entre 600 y 1000ms; además, el tiempo de reacción de la musculatura submental es rápido (68), y su RMO es corta (<740ms), con un cierre del VL (<160ms) y del EES (<220ms) rápidos, una alta velocidad del bolo (>35cm/s) y una intensa fuerza lingual de propulsión (>0,33mJ) (69). En cambio, la RMO en pacientes con disfagia está alterada, especialmente aquellos con disfagia neurogénica (45,68,69). Estos pacientes presentan un tiempo de reacción de la musculatura submental prolongado (68) y un retraso de la fase inicial de la deglución (reconfiguración de la vía aérea a digestiva) que alarga la duración de la RMO. Además, el tiempo de cierre del VL y del EES es el doble que en personas sanas, lo que aumenta la posibilidad de que sufran degluciones no seguras y aspiraciones (45,69) (**Figura 15**). También se ha observado como presentan una menor velocidad del bolo (<10cm/s) debido a que presentan una propulsión lingual más débil (<0,14mJ), lo que provoca una mayor presencia de residuo orofaríngeo tras la deglución, siendo así degluciones con eficacia alterada (69).

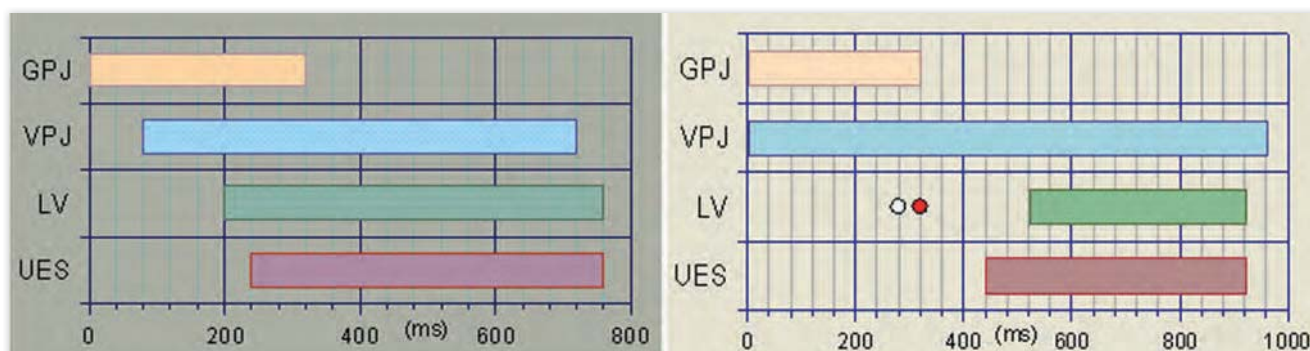


Figura 15. Tiempos de la RMO en voluntarios sanos (izquierda) y en pacientes con DO (derecha). Imágenes reproducidas de Clavé et al (2006) (69).

En estudios de sensibilidad orofaríngea realizados en personas de distintas edades estimulando con pulsos de aire el área inervada por los pares craneales IX y X, se determinó que el umbral de sensibilidad en adultos de entre 20 y 40 años es de $2,07 \pm 0,20$ mm Hg, en adultos de entre 41 y 60 años es de $2,22 \pm 0,34$ mm Hg y para mayores de 61 años es de $2,68 \pm 0,63$ mm Hg, con un coeficiente de correlación entre la edad y la sensibilidad orofaríngea de $r = 0,62$ ($p < 0,0001$), mostrando así que el umbral de sensibilidad en mayores de 61 años es significativamente mayor que en menores de 60 (70). Se han realizado estudios similares en pacientes con ictus (unilateral o bilateral, supratentorial o infratentorial)

mostrando un aumento significativo del umbral de sensibilidad en la hipofaringe ($6,05 \pm 1,22$ mm Hg) que correlaciona con una mayor prevalencia de aspiraciones silentes en estos pacientes (71). También se ha observado esta correlación entre un umbral de sensibilidad faríngea elevado y mayor riesgo de aspiraciones en pacientes con enfermedad de Parkinson (72). En estudios con potenciales evocados sensoriales faríngeos nuestro grupo ha observado cómo el umbral de percepción sensorial en ancianos de un estímulo eléctrico intrafaríngeo era casi el doble que en individuos jóvenes y además la amplitud de los diferentes picos del potencial sensorial registrado por EEG era menor. Al estudiar con potenciales evocados a ancianos con DO se ha observado además un incremento en la latencia. Estas observaciones están relacionadas con una peor conexión faringo-cortical y con patrones de activación cortical alterados (73) (**Figura 16**). En todos estos estudios de sensibilidad también se ha observado una RMO alterada, resaltando la estrecha relación entre la percepción sensorial orofaríngea y un correcto control motor de la respuesta deglutoria (74).

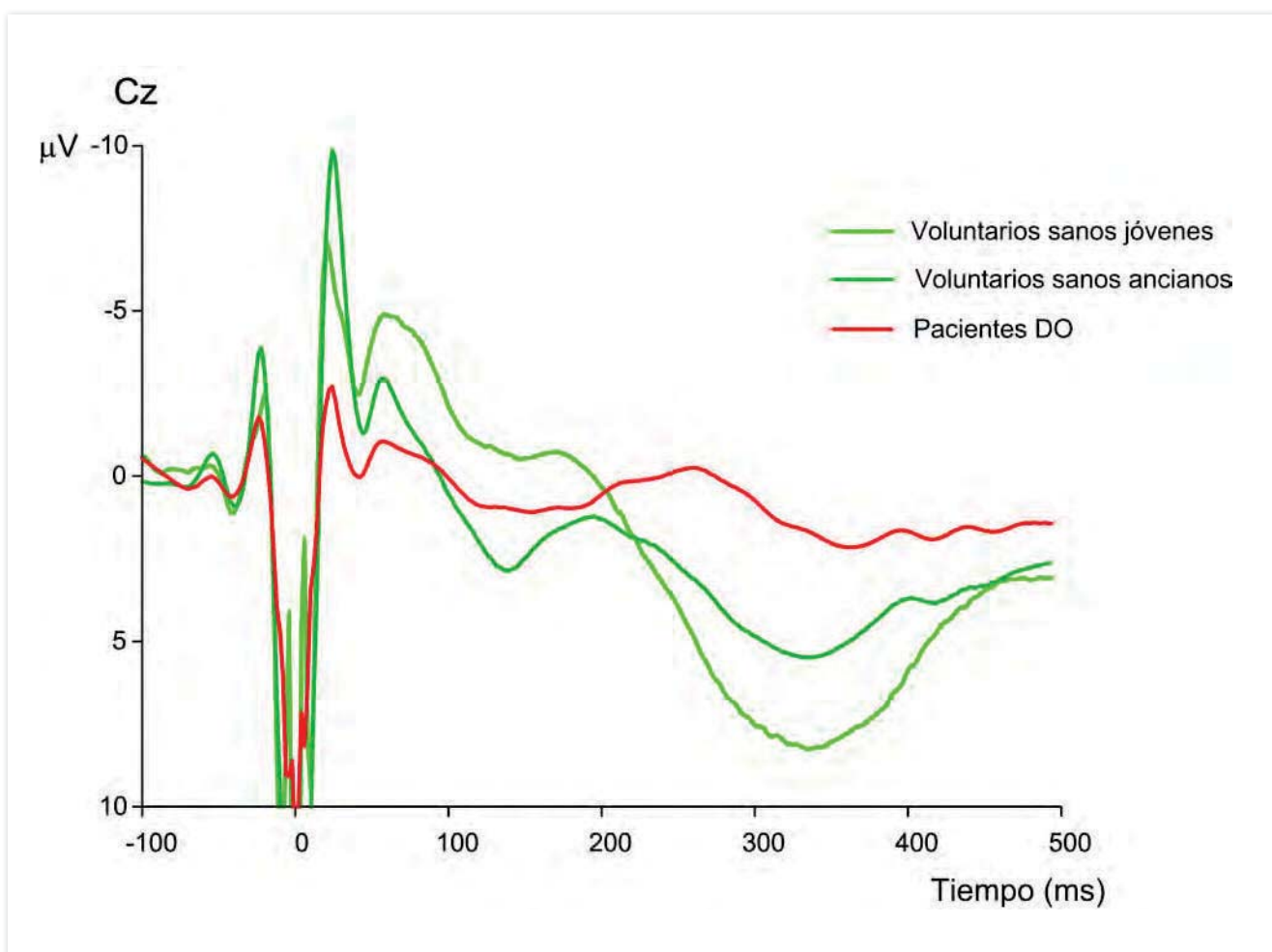


Figura 16. Potenciales sensoriales evocados faríngeos. Imagen adaptada de Rofes et al (2017) (73).

A nivel clínico, estas alteraciones de la fisiología deglutoria se traducen en dos tipos de alteraciones de la función deglutoria: 1) alteraciones de la eficacia y 2) alteraciones de la seguridad.

- **Alteraciones de la eficacia:** se caracterizan por la incapacidad o dificultad para transportar el bolo alimentario debido a baja fuerza de propulsión de la lengua y mal control muscular de los músculos

orofaríngeos, lo que lleva a la aparición de residuo orofaríngeo (75). Las alteraciones de eficacia pueden causar malnutrición y/o deshidratación, ya que los pacientes no pueden ingerir eficazmente los nutrientes y líquidos necesarios para mantener un estado hídrico y nutricional óptimo. La malnutrición puede provocar disfuncionalidad, sarcopenia, alteraciones inmunitarias, deterioro de la cicatrización de las heridas, hipovolemia, fragilidad y mayor mortalidad (76). Se ha demostrado que hay una fuerte relación entre DO y malnutrición entre los ancianos, con un riesgo de malnutrición del 21.7% entre aquellos ancianos con DO que viven en la comunidad (77), del 30-45% entre los que están hospitalizados (60,78) o del 32% entre ancianos institucionalizados (79,80). También en enfermedades neurodegenerativas, como el Parkinson, se ha observado que la presencia de DO podría estar asociada a peor estado nutricional de estos pacientes (81).

- **Alteraciones de la seguridad:** se caracterizan por la entrada de parte del bolo en la vía respiratoria en forma de penetraciones del VL o aspiraciones a través de las cuerdas vocales debido a un retraso del cierre del VL. Las alteraciones de la seguridad pueden causar infecciones respiratorias de las vías bajas y neumonía aspirativa. Cuando estos aspiran saliva, líquido o bolo alimenticio colonizado por patógenos respiratorios, éstos llegan a la vía respiratoria causando una infección pulmonar que puede originar una neumonía por aspiración (82,83). Se considera que las aspiraciones en ancianos pueden causar neumonía en el 50% de los casos con una mortalidad asociada del 50% (84). Se ha observado que hasta al 10% de los ancianos de la comunidad y hasta al 30-50% de ancianos institucionalizados ingresados en un hospital por una neumonía se les diagnostica neumonía aspirativa (84,85). En pacientes con ictus hasta el 20% acabará desarrollando neumonía aspirativa durante los primeros días del accidente cerebrovascular y ésta será la primera causa de muerte en estos pacientes durante primer año tras el alta hospitalaria (84,86).

5. Tratamiento de la disfagia orofaríngea

5.1. Práctica clínica habitual

Actualmente, la práctica clínica habitual para el manejo y tratamiento de pacientes con disfagia se basa en la compensación de los síntomas clínicos de la disfagia y sus complicaciones derivadas. Por un lado, se adapta nutricionalmente la dieta de los pacientes para evitar la malnutrición y deshidratación que causan las alteraciones en la eficacia de la deglución a la vez que se rehabilita la función deglutoria con ejercicios rehabilitadores de logopedia. Por otro lado, se modifica la viscosidad de los líquidos con espesantes y la textura de los alimentos para evitar las penetraciones y aspiraciones provocadas por las alteraciones en la seguridad de la deglución (69). El mecanismo por el cual los espesantes mejoran la seguridad de la deglución es ralentizar la caída del bolo a la faringe para dar tiempo a que se cierre el vestíbulo laríngeo, pero esto también aumenta la cantidad de residuos orales y faríngeos que quedan tras la deglución. También se recomiendan posturas y maniobras que reduzcan el riesgo de aspiración.

En los últimos años también se ha visto cómo una mala higiene oral aumenta el riesgo de infecciones respiratorias de las vías bajas en pacientes con disfagia moderada o severa, ya que la flora bacteriana de la boca es la que en última instancia llega a los pulmones en caso de aspiración; por lo tanto, es importante mantener una buena higiene oral en pacientes con disfagia.

A pesar que estos tratamientos y medidas compensan los síntomas de la disfagia orofaríngea, no hay evidencias que indiquen que con ellos se mejore la fisiología de la deglución y, por lo tanto, no se está tratando específicamente la enfermedad.

5.2. Nuevos tratamientos sensoriales

Desde hace algunos años, se han comenzado a desarrollar nuevas estrategias de tratamiento activo de la DO basadas en incrementar la estimulación sensorial orofaríngea; de esta manera se espera compensar la pérdida de sensibilidad orofaríngea que causa las alteraciones en la seguridad de la deglución. Entre las estrategias que se han seguido se ha probado la estimulación mecánica, térmica, eléctrica y química de la orofaringe (87).

La estimulación orofaríngea puede realizarse antes de la deglución o durante la deglución y su objetivo es sensibilizar la región para que haya una mejor percepción sensorial del bolo y así propiciar una correcta activación de la RMO.

En algunos estudios, incluso se ha observado que, además del efecto puntual, algunos de estos tratamientos tienen un efecto a medio y largo plazo gracias a que promueven la plasticidad cortical, aumentando así la representación cortical de las áreas involucradas en la deglución gracias a la estimulación sensorial orofaríngea. Además, los cambios en los patrones o frecuencias de estimulación periférica pueden llevar a cambios en las neuronas del núcleo del tracto solitario, como el aumento de la excitabilidad de estas neuronas o una mayor presencia y liberación de neuropéptidos que contribuirían a mejorar la RMO (88).

5.3. Tratamiento sensorial mecánico y térmico

La estimulación mecánica y térmica fue cronológicamente la primera que se utilizó en pacientes con DO. Es conocido que la región que mejor activa la respuesta deglutoria por estímulo mecánico se encuentra cerca de los pilares posteriores (89) y diversos grupos han aplicado estímulos mecánicos o mecánico-térmicos a esta región para mejorar la deglución en pacientes con disfagia neurogénica. Se ha comprobado que la combinación de estímulo mecánico y frío sobre esta región con una sonda metálica es la más eficiente para inducir la deglución (90); tratar a pacientes con disfagia neurogénica con este método mejora la activación de la RMO (91), reduciendo los tiempos de tránsito faríngeo y mejorando el retraso de la fase faríngea en pacientes con Parkinson (92). También se han utilizado pulsos de aire para estimular mecánicamente la orofaringe en pacientes de ictus con disfagia, consiguiendo mejoras en la velocidad de deglución y en la frecuencia espontánea de la deglución de estos pacientes (93).

El uso de estímulo térmico por sí solo también se ha mostrado como una estrategia terapéutica eficaz en el tratamiento de pacientes con disfagia. Cambiando la temperatura del bolo a 10-20°C o 60-80°C, es decir, por encima o por debajo de la temperatura corporal, se ha conseguido acelerar el inicio de la RMO y así tratar la disfagia de pacientes ancianos con neumonía aspirativa (94).

Se considera que el efecto terapéutico de estas estrategias se debe principalmente a la sensibilización de los receptores mecánicos y térmicos localizados en los pilares posteriores (95), aunque, en el caso de la estimulación mecánica, también puede haber un efecto de plasticidad y neuromodulación ligado a la inducción repetida de la deglución, lo que llevaría a una reorganización neuronal en los centros de la deglución (93).

5.4. Tratamiento sensorial eléctrico. Estimulación eléctrica intrafaríngea y transcutánea

Estudios en animales han demostrado que además del nervio Ph-IX que inerva los pilares posteriores, el NLSI también juega un papel importante en la activación de la respuesta deglutoria y es una diana importante en la inducción de respuesta deglutoria con estímulo eléctrico, mientras que la estimulación

de la L-IX parece tener un efecto inhibitorio y la estimulación de Ph-X no parece tener efecto significativo (96). También se ha observado que la estimulación de la Ph-IX y del NLSI de forma simultánea tiene un efecto mayor que la estimulación de cada uno de estos por separado (97). Se considera que el efecto del estímulo eléctrico se produce a través de canales iónicos voltaje-dependientes de estos nervios, que trasladarán la señal a áreas superiores del sistema nervioso induciendo así el inicio de la respuesta deglutoria.

A partir de estos estudios con animales se han desarrollado dos tipos de estimulación eléctrica como tratamiento de la DO:

- **Estimulación eléctrica intrafaríngea:** esta técnica se basa en la aplicación de corrientes eléctricas con una frecuencia de 5Hz durante 10 minutos a través de electrodos situados en una sonda intrafaríngea. Se ha probado en pacientes con disfagia en la fase aguda del ictus, a los que se les aplicó este tratamiento durante 3 días, y se ha observado como se producía una reducción significativa del tiempo de RMO y de la prevalencia de aspiraciones, consiguiendo así mejorar el nivel nutricional del paciente y reducir el tiempo de estada hospitalaria (98,99). Además del efecto clínico también se observó una mayor excitabilidad corticobulbar y una mayor representación topográfica de la faringe en el hemisferio no dañado por el ictus (98).
- **Estimulación eléctrica transcutánea:** esta técnica se basa en la aplicación de corrientes eléctricas con una frecuencia de 80Hz durante 1 hora al día a través de electrodos cutáneos similares a los utilizados en la estimulación muscular, colocados sobre el cuello. Tanto la aplicación de corrientes a intensidad sobre el umbral de contracción muscular como a intensidad entre el umbral sensorial y el umbral de contracción se han mostrado eficaces en la reducción de los tiempos de RMO y la prevalencia de aspiraciones en pacientes con disfagia en fase crónica de ictus (100–102). Tras dos semanas de tratamiento se ha visto como la estimulación eléctrica promueve la reorganización cortical a largo plazo, mejorando así la deglución en pacientes con daño cerebral (103).

5.5. Tratamiento sensorial farmacológico

La mucosa orofaríngea percibe un amplio abanico de estímulos químicos a través de los botones gustativos y los terminales libres, recogidos principalmente por los nervios trigémino, facial, glossofaríngeo y laríngeo superior (NLSI). Se ha intentado utilizar la estimulación química para mejorar la RMO en pacientes con DO, buscando así una aproximación farmacológica al tratamiento de la disfagia.

Algunos estudios en pacientes con ictus o cáncer de cabeza y cuello con DO han utilizado distintos sabores percibidos por los botones gustativos. Así se ha podido comprobar que el sabor salado prolonga y retarda el tiempo de deglución mientras que el sabor dulce acorta la RMO con un efecto a corto plazo; en estos estudios el sabor con mayor efecto sobre la deglución es el ácido, que acorta de forma intensa y consistente la RMO (104,105). Sin embargo, el pH ácido también es percibido por los terminales libres a través de otros receptores y mecanismos, por lo que dicho efecto podría estar más relacionado con este parámetro químico que no con la característica organoléptica.

Los estimulantes químicos más utilizados para tratar la DO son:

- **Ácido:** el uso de bolos ácidos, con el 50% de zumo de limón, fue una de las primeras estrategias utilizadas para estimular la RMO en pacientes con DO neurogénica. En estos estudios los pacientes mejoraron en el inicio y el tiempo de tránsito de la fase oral de la deglución, redujeron el retraso en el tiempo faríngeo y mejoró tanto la eficiencia como la seguridad de la deglución, reduciendo así la prevalencia

de aspiraciones (104). En otro estudio se comprobó como una concentración del 2.7% de ácido cítrico mejoraba de forma significativa la deglución al reducir la prevalencia de aspiraciones, pero mezclar ácido cítrico 1.11% con sucrosa 8% no tiene efecto significativo en la RMO (106). En cambio, el uso de bolos ácidos con baja temperatura reduce significativamente el tiempo de tránsito oral y faríngeo en pacientes de DO por ictus (107,108). Las soluciones ácidas, además de actuar sobre los botones gustativos inervados por el nervio facial y glossofaríngeo, también actúa sobre las terminaciones libres de los nervios trigémino, glossofaríngeo y NLSI. En estudios con ratas se ha observado como el uso de ácido acético o cítrico 5-30mM estimula y sensibiliza la rama Ph-IX y el NLSI facilitando así la deglución (109).

- **Picante:** los ingredientes picantes o pungentes como la capsaicina (*Capsicum sp*) o la piperina (*Piper nigrum*) se han utilizado también en pacientes de DO neurogénica para comprobar su efecto terapéutico. En un estudio, la administración aguda de capsaicina a 10^{-8} - 10^{-6} M redujo el retraso en la respuesta deglutoria en pacientes con disfagia (110); en otro estudio, la administración aguda de capsaicina a $1.5 \cdot 10^{-4}$ M en pacientes ancianos, de ictus y de enfermedades neurodegenerativas con DO redujo la prevalencia de penetraciones del bolo en el VL gracias a acortar el tiempo de cierre del VL y mejorar el movimiento del hioides y también redujo la prevalencia de residuos faríngeos al aumentar la fuerza de propulsión lingual (111). La administración diaria de capsaicina 10^{-6} M también reduce el retraso en la respuesta deglutoria en pacientes ancianos con DO severa con riesgo de aspiración (112,113). El uso de piperina también se ha mostrado eficaz tanto en administración aguda como durante 30 días, reduciendo el retraso en iniciar la respuesta deglutoria y mejorando el tiempo de cierre del VL, logrando así reducir la prevalencia de penetraciones (114,115). La estimulación química con estos agentes promueve la liberación de neuropéptidos como la SP y el CGRP, logrando así sensibilizar las neuronas que inervan la orofaringe para que así se active más fácilmente la RMO; el uso de piperina durante un mes incrementó los niveles de SP en sangre comparado con sus niveles previos al tratamiento (114), mientras que se han encontrado niveles hasta siete veces menores de SP en saliva de pacientes ancianos con neumonía aspirativa (116).
- **Mentol:** compuesto obtenido del aceite esencial de la planta de la especie *Mentha piperita* y otras plantas del género *Mentha*, el mentol a 10^{-4} - 10^{-2} M se ha utilizado para tratar a pacientes ancianos con disfagia; en ese estudio los pacientes mostraron un efecto dosis dependiente sobre la activación de la RMO (117).
- **Carbonatación:** también se han utilizado líquidos carbonatados con una mezcla de ácido cítrico y bicarbonato de sodio como estrategia terapéutica para tratar a pacientes con disfagia. Se ha mostrado como los líquidos carbonatados reducen la prevalencia de penetraciones en el VL y las aspiraciones, el tiempo de tránsito faríngeo y el tiempo de retención faríngea respecto al uso de agua sin carbonatar (118,119). Este efecto puede deberse tanto a la acidificación del medio provocada por el dióxido de carbono disuelto en el líquido como a la activación de mecanorreceptores por parte de la burbujas de CO_2 (120,121).

6. Potenciales dianas farmacológicas

Las estrategias terapéuticas basadas en principios farmacológicos actúan principalmente a través de receptores de los terminales libres de los nervios trigémino, glossofaríngeo y vago que inervan la mucosa de la orofaringe. Estos receptores son capaces de percibir un amplio abanico de estímulos químicos y térmicos. Los principales receptores de estos estímulos son una familia de canales iónicos multimodales especializados conocidos como canales *transient receptor potential* (TRP) que se abren bajo ciertas circunstancias permitiendo la entrada de calcio a la célula, lo que puede iniciar un potencial de membrana que produzca una señal nerviosa y, a la vez, iniciar una cascada de señalización que puede tener efectos

de sensibilización y/o desensibilización de estos receptores. La mayoría de estos receptores responden a más de un tipo de estímulo, siendo muchos de ellos sensibles a cambios de temperatura, pH y a sustancias químicas irritantes al mismo tiempo; los diferentes estímulos que activan un receptor pueden sensibilizar el receptor a otros estímulos. Estos receptores están expresados principalmente en los ganglios nerviosos de los nervios que inervan la orofaringe, pero se sabe que también pueden expresarse en células no nerviosas como por ejemplo células epiteliales (122).

6.1. TRPV1

El primer TRP identificado fue el receptor de vaniloides, posteriormente conocido como el miembro 1 de la subfamilia V, TRPV1. Se identificó a través de la expresión heteróloga de una librería de cDNAs en células de mamífero a las que posteriormente se les añadía capsaicina para comprobar si había entrada de calcio en la célula (123). A partir de entonces, se ha encontrado expresión de TRPV1 en múltiples tejidos humanos; en tejidos nerviosos como los ganglios de la raíz dorsal y los ganglios del trigémino (124,125) pero también en tejido no nervioso como células epiteliales de la vejiga urinaria y de la piel (122,126). Se sabe que los canales TRPV1 se encuentran principalmente en las fibras aferentes de tipo A δ y C y que se coexpresa con neuropéptidos proinflamatorios como CGRP y SP.

Una de las funciones principales de TRPV1 es actuar como receptor de estímulos nocivos como el dolor. TRPV1 se activa por temperaturas nocivas ($>43^{\circ}\text{C}$), soluciones ácidas ($\text{pH}<5,5$) y una amplia variedad de compuestos químicos tanto exógenos como endógenos. Su agonista más conocido es la capsaicina, pero también es activado por otros vaniloides, cannabinoides y terpenos, entre otros (**Tabla 1**).

TRPV1	TRPA1	TRPM8
Temperatura ($\geq 43^{\circ}\text{C}$)	Temperatura ($\leq 17^{\circ}\text{C}$)	Temperatura ($\leq 25^{\circ}\text{C}$)
pH ácido	1,4-Dihidropiridinas	Eucaliptol (eucalipto)
2-APB	Alicina (ajo)	Geraniol (geranio, limón)
Alicina (ajo)	Alil isotiocianato (mostaza)	Icilina
Anandamida	Bradiquinina	Linalol (tejpat)
Alcanfor (alcanforero)	Cannabicromeno (cannabis)	Mentol (menta)
Cannabidiol (cannabis)	Cannabidiol (cannabis)	
Cannabigerol (cannabis)	Cannabinol (cannabis)	
Capsaicina (pimientos picantes)	Capsiato (pimientos picantes)	
Eugenol (clavo)	Cinamaldehído (canela)	
Gingerol (jengibre)	Curcumina (cúrcuma)	
Sulfuro de hidrógeno	Eugenol (clavo)	
Óxido nítrico	Gingerol (jengibre)	
Piperina (pimienta negra)	Sulfuro de hidrógeno	
Poligodial (pimienta Dorrigo)	Icilina	
	Óxido nítrico	
	Tetrahidrocannabinol (cannabis)	

Tabla 1. Estimulantes físicos y químicos de los receptores TRPV1, TRPA1 y TRPM8. Adaptada de Alvarez-Berdugo et al (2016) (74).

Los agonistas naturales del TRPV1 se han utilizado en la medicina tradicional china y otras medicinas tradicionales como analgésicos en ungüentos y cataplasmas. Hay también una amplia gama de antagonistas de TRPV1 que desde hace unos años se están utilizando de forma tópica para tratar dolor neuropático (127). Se sabe que la activación de TRPV1 con concentraciones elevadas de capsaicina tiene efectos nocivos para la célula, causando su muerte, y este efecto se ha utilizado para tratar enfermedades inflamatorias como la rinitis idiopática (128).

TRPV1 forma tetrámeros para crear canales iónicos en la membrana celular (129). Cada subunidad del canal presenta 6 dominios transmembrana, y por lo tanto, tanto su extremo C terminal como su extremo N terminal se encuentran en el espacio citosólico. De los 6 dominios transmembrana 4 tienen función sensorial (lugar de unión de vaniloides) y 2 son los que forman el poro del canal. Los dos extremos terminales (dominios citosólicos) son la región que más se diferencia entre las distintas familias de receptores TRP, ya que es donde se regula la propensión a abrir el canal. En el caso de TRPV1 los dominios citosólicos presentan de 4 a 6 *ankyrin repeats*, cuya función es permitir interacciones específicas proteína-proteína, principalmente como punto de unión de calmodulina que modulará la función del canal según el nivel de calcio intracelular (130,131); en los dominios citosólicos de TRPV1 también hay puntos de unión para otras moléculas reguladoras como PIP2, que inhibe la activación del canal, o las fosfatasa PKA y PKC, que sensibilizan el canal al fosforilar sus aminoácidos diana (132,133) (**Figura 17**).

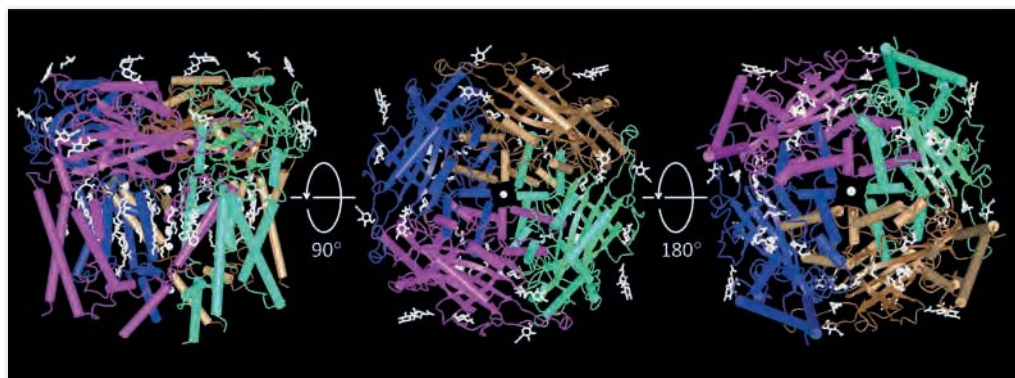


Figura 17. Estructura molecular del canal iónico TRPV1. Imágenes obtenidas de la *Molecular Modeling Database (MMDB)* del *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*.

6.2. TRPA1

Tras la identificación de TRPV1, se han identificado muchos otros miembros de la familia de receptores TRP. Entre ellos, uno de los más importantes es el miembro 1 de la subfamilia A, TRPA1, previamente conocido como ANKTM1. TRPA1 se expresa en neuronas que forman las fibras C, pero no A δ , de los ganglios nodoso, del trigémino y de la raíz dorsal y, en todos los casos, coexpresa con TRPV1 y los neuropéptidos proinflamatorios CGRP y SP (134–137). Además de en fibras nerviosas, se ha encontrado expresión de TRPA1 en fibroblastos y células epiteliales de la piel y del epitelio bronquial (138,139), así como también en las células ciliadas del oído (140).

TRPA1 es el receptor que percibe el frío nocivo (<18°C), así como también irritantes naturales y sintéticos como el isotiocianato de alilo (de la mostaza), el cinamaldehído (de la canela), la piperina (de la pimienta negra), la alicina y el disulfito de dialilo (del ajo), entre otros (**Tabla 1**). También se relaciona la activación de TRPA1 con el efecto del mentol a bajas concentraciones (141). Además, se ha relacionado TRPA1 con la capacidad mecanorreceptiva de los quinocilios del oído interno.

A nivel estructural, TRPA1 sigue un modelo similar al resto de TRP, con 6 dominios transmembrana y un dominio que forma el poro del canal. Su principal característica distintiva se encuentra en su dominio citosólico N terminal, donde se pueden encontrar hasta 17 *ankyrin repeats* que adoptan la forma de un muelle. Se cree que esta estructura es la que le permite realizar funciones mecanorreceptivas en el oído (142) (**Figura 18**).

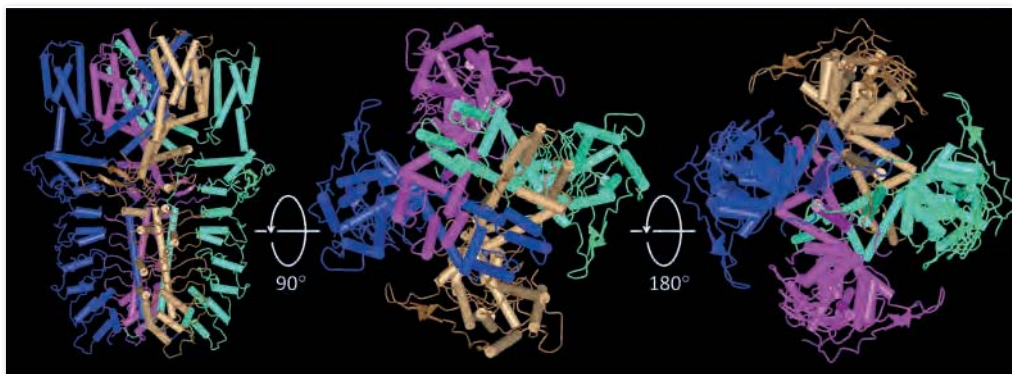


Figura 18. Estructura molecular del canal iónico TRPA1. Imágenes obtenidas de la Molecular Modeling Database (MMDB) del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

6.3. TRPM8

El miembro 8 de la subfamilia M de los receptores TRP, TRPM8, se expresa en una subpoblación de neuronas sensoriales periféricas de pequeño diámetro (10-15%) que forma las fibras tipo C. Además, estas neuronas no coexpresan TRPV1 ni CGRP (143). Fuera del sistema nervioso, se ha encontrado expresión de TRPM8 en diferentes tipos de tumores sólidos, donde participa en la proliferación, supervivencia y invasión de estas células, convirtiéndose así en una importante diana terapéutica para tratar el tumor (144).

TRPM8 es el receptor de los estímulos fríos no nocivos (entre 15-30°C) así como también de sustancias químicas con efecto refrescante como el mentol, la icilina y el eucaliptol.

A nivel estructural, TRPM8 sigue una estructura típica de otros receptores TRP, pero en sus dominios citosólicos no presenta ningún *ankyrin repeat*. En cambio, presenta regiones de alta homología (MHR) que permite que las subunidades de TRPM8 lleguen a la membrana celular y se unan para formar el canal (145). Actualmente no existe modelo experimental de la estructura del canal iónico TRPM8.

6.4. Otros receptores

Además de TRPV1, TRPA1 y TRPM8 hay otros canales TRP involucrados en la percepción de estímulos sensoriales. TRPV2 responde a estímulos térmicos nocivos (>52°C) (146), TRPV3 responde a cambios de temperatura dentro del rango fisiológico (entre 22 y 40°C) (147) y TRPV4 responde a cambios osmóticos y a estímulos mecánicos nocivos (148,149). Se ha localizado TRPV2 en nervios que inervan la mucosa de la faringe, el paladar blando, la epiglotis y la laringe de rata (150). Se ha encontrado expresión de TRPV3 en queratinocitos y neuronas de ratón (151-153). La expresión de TRPV4 se ha encontrado en tráquea y glándulas salivares humanas (154). TRPC1 y TRPC6 están involucrados, junto a TRPV4 en la percepción de estímulos mecánicos nocivos (149).

Además de los canales TRP, también hay otras familias de receptores que están relacionadas con la percepción química y física. La familia ASIC está relacionada con la percepción de ácido y de estímulos mecánicos (155,156). Se conoce su expresión en los receptores gustativos y en el tracto digestivo. Forman canales heteroméricos entre los distintos miembros de la familia que permiten la percepción de distintos rangos de acidez (156). Otra familia de receptores que interviene en la percepción de estímulos

químicos es KCNK, canales de potasio que son inhibidos por el *sanshool* de la pimienta de Sichuan, provocando así la estimulación sensorial (157).

6.5. El futuro del tratamiento farmacológico de la DO

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han patentado diversas estrategias farmacológicas para tratar la disfagia basadas en el uso de agonistas de receptores TRP, como los capsaicinoides (158,159). Además, estudios recientes han mostrado como algunos tratamientos habituales para otras enfermedades pueden tener un efecto protector respecto a la incidencia de neumonía por aspiración gracias a mejorar la respuesta deglutoria. Por un lado, hay fármacos que inhiben la degradación de sustancia P, mejorando así el reflejo deglutorio y de la tos, como por ejemplo los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) o el cilostazol, un inhibidor de fosfodiesterasa III (160–162). Por otro lado, fármacos utilizados a largo plazo para favorecer la liberación de dopamina, como la amantadina o la teofilina han demostrado reducir la incidencia de neumonía por aspiración al mejorar el reflejo deglutorio (160).

Con esta Tesis Doctoral esperamos dar respuesta a cómo y dónde actúan los agonistas de receptores TRP y sentar las bases para el desarrollo de una nueva batería de tratamientos que permitan pasar de la compensación con espesantes al tratamiento farmacológico con estimulantes de la respuesta motora orofaríngea. Sin duda, esto permitirá reducir e incluso evitar las graves complicaciones nutricionales y respiratorias asociadas a la disfagia orofaríngea en pacientes ancianos y con enfermedades neurológicas.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

1. Los estímulos que activan la deglución se perciben a través de los distintos tipos de terminaciones sensoriales de los nervios que inervan la mucosa oral, orofaríngea y laríngea. Es necesario mejorar el conocimiento de la morfología y localización de estas terminaciones sensoriales para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas basadas en la estimulación de la respuesta deglutoria.
2. Los receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8 y ASICs se expresan y/o localizan en humanos en las áreas sensoriales inervadas por los pares craneales V, IX y X donde juegan un papel importante en la percepción de estímulos químicos no gustativos relacionados con la activación cortical de las áreas sensoriales implicadas en la deglución y la respuesta motora orofaríngea. El estudio de la localización mediante técnicas inmunohistoquímicas y el estudio de la expresión mediante técnicas de biología molecular permitirá mejorar el conocimiento de los mecanismos de activación sensorial en la orofaringe y laringe humanas.
3. Es posible estudiar la farmacodinamia del receptor TRPV1 en un bioensayo in vitro con tejido humano que exprese constitutivamente TRPV1. El receptor TRPV1 puede ser activado de forma específica por agonistas naturales como la capsaicina, la piperina y otras mezclas de capsaicinoides y el efecto de dichos agonistas se ve reducido por antagonistas específicos.
4. El uso de agonistas de los receptores TRPV1, TRPA1 y TRPM8 puede reducir la prevalencia de síntomas relacionados con la alteración de la seguridad y la eficacia de la deglución en pacientes con disfagia y constituir el primer paso para el desarrollo de un tratamiento farmacológico para los pacientes con disfagia.
5. La estrategia terapéutica basada en el uso de estimulantes de TRPV1, TRPA1 y TRPM8 actúa de forma distinta a la adaptación de la viscosidad de los fluidos con el uso de espesantes de la práctica clínica habitual y supone un cambio de paradigma de tratamiento: de la compensación mediante espesantes a la recuperación de la función deglutoria mediante estimulantes farmacológicos que aceleren la respuesta motora orofaríngea.

OBJETIVOS

1. Estudiar la anatomía y la histología de la inervación sensorial orofaríngea en humanos para conocer en profundidad la distribución y localización de los nervios aferentes de la región y las posibles alteraciones que pueden alterar la sensibilidad orofaríngea.
2. Estudiar la expresión y localización de posibles dianas terapéuticas para tratar la DO en tejido de individuos sanos.
 - 2.1. Estudiar la expresión a nivel de mRNA de TRPV1, TRPA1, TRPM8 y ASIC3 en la mucosa del dorso de los 2/3 anteriores de la lengua, en la mucosa que recubre los pilares anteriores, en la mucosa que recubre la pared posterior de la faringe y en la mucosa que recubre la cara lingual de la epiglotis, en las regiones inervadas por los NC V, IX y X.
 - 2.2. Estudiar la localización histológica de TRPV1, TRPA1, TRPM8 y ASIC 3 en la mucosa del dorso de los 2/3 anteriores de la lengua, en la mucosa que recubre la pared posterior de la faringe y en la mucosa que recubre la cara lingual de la epiglotis, en las regiones inervadas por los NC V, IX y X.
3. Estudiar la farmacodinámica de agonistas naturales de TRPV1 *in vitro* en células PC3 que expresan de forma natural estos receptores.
 - 3.1. Estudiar los parámetros farmacodinámicos de la capsaicina, la piperina y una mezcla de capsaicinoides naturales
 - 3.2. Estudiar el efecto de desensitización de TRPV1 por una exposición repetida a capsaicina, piperina y capsaicinoides naturales.
 - 3.3. Estudiar la especificidad del efecto de la capsaicina, la piperina y los capsaicinoides naturales sobre TRPV1 utilizando SB366791, un antagonista específico de TRPV1.
4. Comparar en estudios clínicos con pacientes de disfagia el efecto de los distintos tratamientos farmacológicos (TRPV1, TRPA1, TRPM8) entre sí y respecto al tratamiento compensatorio habitual mediante incrementos de viscosidad del bolo con espesantes.
 - 4.1. Comparar el efecto sobre la seguridad y la eficacia de los tratamientos con capsaicinoides, piperina y mentol en pacientes ancianos, post-ictus y con enfermedades neurodegenerativas con DO.
 - 4.2. Relacionar las diferencias de efecto de los distintos tratamientos con las diferencias de expresión y localización de los receptores que median dicho efecto estimulante de la deglución.



PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

1. Muestras biológicas

Las muestras biológicas de tejido orofaríngeo fueron obtenidas por los cirujanos del servicio de otorinolaringología del Hospital de Mataró (Consorci Sanitari del Maresme) y del Hospital Universitari

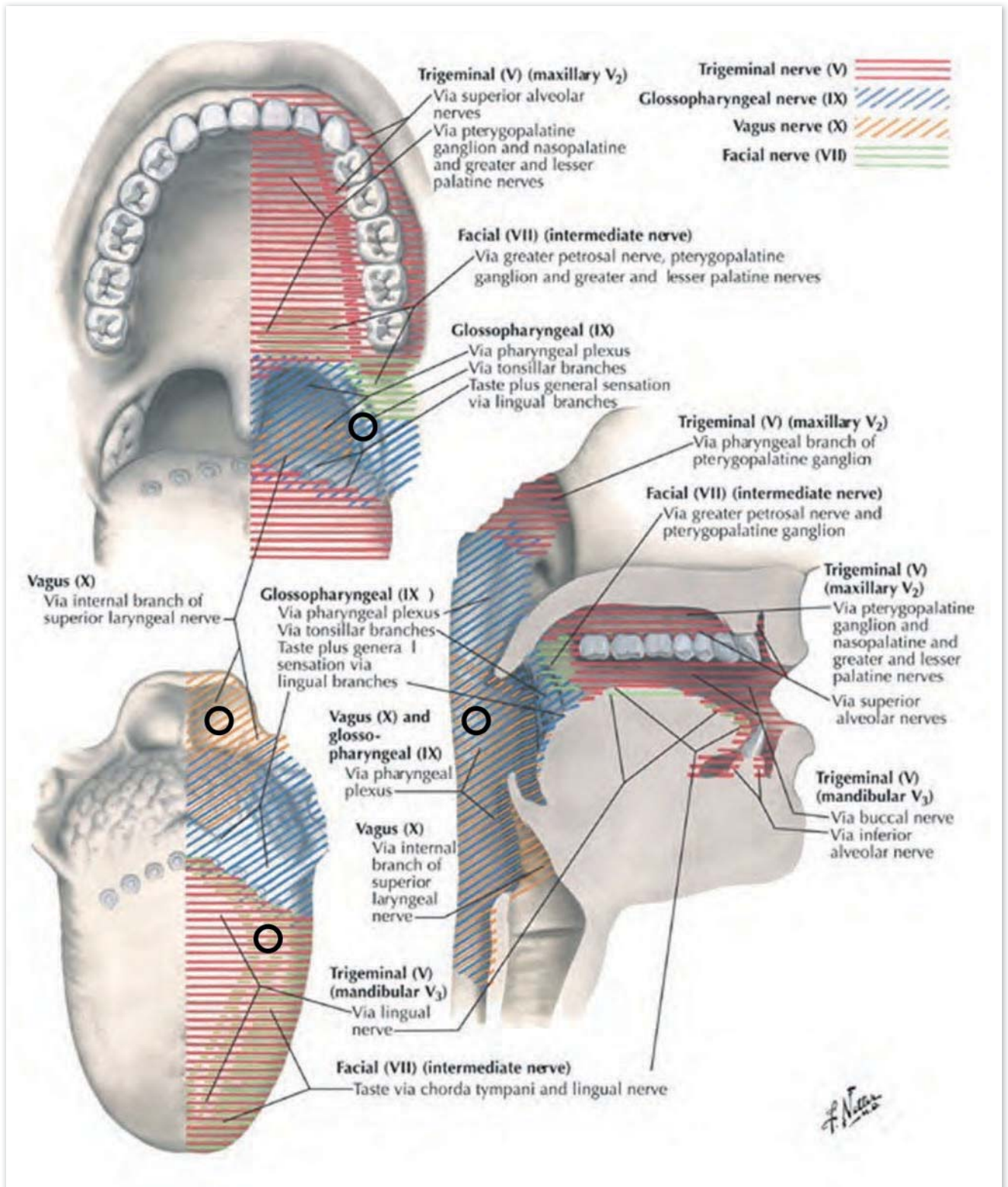


Figura 1. Localización de las zonas de obtención de biopsias. Imagen adaptada de Norton (2011) (3).

Germans Trias i Pujol (Institut Català de Salut), de pacientes intervenidos de cirugías mayores de cabeza y cuello previo consentimiento informado de los pacientes. Se recogieron muestras de las zonas inervadas por los pares craneales V, VII, IX y X, anatómicamente localizadas en el dorso del cuerpo de la lengua (nervio lingual), en los pilares posteriores (L-IX), en la pared posterior de la faringe (Ph-IX y Ph-X) y en la cara lingual de la epiglotis (L-IX y NLSI) (**Figura 1**). Para el procesamiento de las mismas se ha contado con la colaboración del Servicio de Anatomía Patológica del Consorci Sanitari del Maresme.

Cualquiera fuera su destino, todas las muestras recibían un código interno con el cual eran identificadas. La recolección y almacenamiento de muestras se realizó obedeciendo la ley española de uso y almacenamiento de tejido humano (Ley 14/2007 Título V Capítulo III) hasta la entrada en vigor de la actual ley española que la sustituye (Real Decreto-Ley 9/2014). El Comité de Ética del Consorci Sanitari del Maresme aprobó los estudios bajo el código 22/09 (Anexo 2). Este estudio también fue aprobado por el Comité de Ética en la Investigación del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol con el código PI-16-049 (Anexo 2). Los datos de los pacientes fueron tratados de acuerdo a la Ley Orgánica de Protección de datos 15/1999 del 13 de diciembre de Protección de datos de Carácter personal (Artículo 3, punto 6 del real decreto 223/2004).

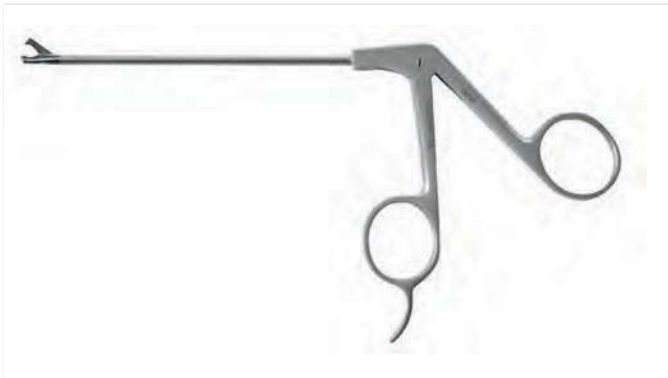


Figura 2. Pinza básquet quirúrgica.

1.1. Muestras biológicas para histología colorimétrica

Las muestras biológicas para histología convencional se recogieron con pinza básquet (**Figura 2**) o con el bisturí de zonas libres de tumor y se depositaron en una solución al 5% de formol. Se conservaron en formol a 4°C hasta un máximo de 24 horas hasta ser procesadas con un protocolo rutinario de infiltración al vacío con el Tissue-Tek® VIP Vacuum Infiltration Processor y sus reactivos (Sakura Finetek, Tokio, Japón) (**Figura 3**). Una vez infiltradas, las muestras fueron orientadas por una patóloga del CSdM y fijadas en bloques de parafina.



Figura 3. Tissue-Tek® VIP Vacuum Infiltration Processor.

1.2. Muestras biológicas para inmunohistoquímica fluorimétrica

Las muestras biológicas para inmunohistoquímica con marcaje fluorescente se recogieron con pinza básquet o con el bisturí de zonas libres de tumor y se depositaron en una solución al 5% de formol. Se conservaron en formol a 4°C entre 1-2 horas, entonces se realizaron 3 lavados con tampón salino de fosfato (PBS) y se introdujeron en una solución de crioprotección de tampón fosfato con 20% de sucrosa. Las muestras se conservaron en dicha solución a 4°C un mínimo de 3 días hasta ser orientadas por una patóloga y fijadas en el compuesto *Optimal Cutting Temperature* (OCT) Tissue-Tek® (Sakura Finetek, Tokio, Japón) a -25°C. Una vez congeladas, las muestras se conservaron a -80°C hasta su uso.

1.3. Muestras biológicas para biología molecular

Las muestras biológicas para técnicas de biología molecular se recogieron con pinza básquet de zonas libres de tumor y se depositaron en solución RNA^{later}® (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EEUU). Se conservaron en dicha solución entre 1 día y una semana a 4°C y entonces se renovó el medio y se congelaron las muestras a -25°C hasta su uso. El material utilizado para procesar estas muestras tiene certificado de no presentar RNAsa, DNA, ni DNAsa.

2. Métodos histología

2.1. Tinciones colorimétricas

Las muestras fijadas en parafina fueron cortadas a temperatura ambiente con un micrótomos (**Figura 4**) a 4 µm de grosor y colocadas sobre portaobjetos Dako FLEX (Dako, Glostrup, Dinamarca) para inmunohistoquímica. Las tinciones colorimétricas realizadas fueron:



Figura 4. Micrótomos.

1. **Hematoxilina Eosina** para observar la histología general del tejido. La tinción fue realizada con el dispositivo ST4020 (Leica Biosystems, Nussloch, Alemania) o el Tissue-Tek® DRSTM™ (Sakura Finetek, Tokio, Japón) (**Figura 5**) y sus respectivos reactivos. La hematoxilina tiñe los núcleos de color púrpura y la eosina tiñe el citosol de color rosáceo.



Figura 5. Tissue-Tek® DRSTM (izquierda). Leica ST-4020 (derecha).

2. **Enolasa específica neuronal (NSE)**, un marcaje con anticuerpo para observar las fibras nerviosas del tejido. La tinción fue realizada con el dispositivo AutostainerLink 48 y sus reactivos (Dako, Glostrup, Dinamarca) (**Figura 6**). Este marcaje muestra las fibras nerviosas de color marrón mientras que una tinción de base deja los núcleos azules.



Figura 6. AutostainerLink 48 de Dako.

Las preparaciones fueron observadas con un microscopio óptico Nikon Eclipse E600 (Nikon, Tokio, Japón) y se tomaron microfotografías con una cámara digital Olympus DP20 (Olympus, Tokio, Japón) acoplada al microscopio (**Figura 7**).



Figura 7. Microscopio óptico Nikon Eclipse E600 (izquierda). Cámara digital Olympus DP20 (derecha).

2.2. Tinciones fluorimétricas

Las muestras fijadas en OCT fueron cortadas a -25°C con un criostato (**Figura 8**) a 6-10 μm de grosor y conservadas a -25°C hasta ser utilizadas.



Figura 8. Criostato Leica CM 1950 (izquierda). Detalle de la platina de corte (derecha).

Las preparaciones histológicas fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) 0,1M, permeabilizadas con Tritón al 0,5% e incubadas con solución de bloqueo HBBS con suero de cabra al 10% antes de incubarlas con los anticuerpos primarios (**Tabla 1**) disueltos en HBBS con suero de cabra al 10% a 4°C durante más de 12 horas. Entonces se realizaron lavados de la preparación y se incubaron con los anticuerpos secundarios (**Tabla 1**) diluidos en HBSS con suero de cabra al 10% a 37°C durante una hora. Finalmente, las preparaciones fueron incubadas con tinción nuclear Hoechst (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EEUU) y montadas con Fluoprep (BioMérieux, Rhône-Alpes, Francia).

Marcaje	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
TRPV1	Rabbit Anti-TRPV1 policlonal (Alomone Labs, Jerusalén, Israel)	Goat Anti-Rabbit A568 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EEUU)
TRPA1	Rabbit Anti-TRPA1 policlonal (Alomone Labs, Jerusalén, Israel)	Goat Anti-Rabbit A568 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EEUU)
TRPM8	Rabbit Anti-TRPM8 policlonal (Alomone Labs, Jerusalén, Israel)	Goat Anti-Rabbit A568 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EEUU)
ASIC3	Rabbit Anti-ASIC3 policlonal (Alomone Labs, Jerusalén, Israel)	Goat Anti-Rabbit A568 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EEUU)
NSE	Mouse Anti-NSE (5G10) monoclonal (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EEUU)	Goat Anti-Mouse Cy5 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EEUU)

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para el marcaje de los receptores y las fibras nerviosas en las preparaciones de inmunohistoquímica para ser observadas en confocal.

Las preparaciones fueron observadas con un microscopio láser confocal SP5 de Leica (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) (**Figura 9**) con objetivos de 20x y 40x. Se registraron y analizaron las microfotografías a través del software *Leica Application Suite Advanced Fluorescence* (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).



Figura 9. Microscopio láser confocal SP5 de Leica (izquierda). Equipo para la observación y toma de microfotografías del microscopio confocal (arriba).

El diseño experimental de la inmunohistoquímica incluía controles de bloqueo para cada uno de los anticuerpos utilizados con el antígeno suministrado por el fabricante del anticuerpo para comprobar que el anticuerpo primario no se une de forma inespecífica al tejido, así como también controles de anticuerpo secundario sin el anticuerpo primario para comprobar que el anticuerpo secundario no se une al tejido y controles de autofluorescencia sin ningún anticuerpo para comprobar si el tejido presenta autofluorescencia.

3. Métodos biología molecular

Las muestras conservadas en RNAlater® fueron descongeladas y pesadas. Independientemente del método de extracción, las muestras fueron congeladas en vapor de nitrógeno líquido y machacadas en un mortero para facilitar su posterior homogenización.

3.1. Extracción RNA. Método Trizol

Para extraer el RNA con el método del Trizol® (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EEUU), el tejido machacado fue introducido en el reactivo Trizol®, homogeneizado en frío con un sonicador Sonifier®150 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EEUU) (**Figura 10**) y mezclado con cloroformo; para poder separar la fase acuosa (que contiene los ácidos nucleicos) de la fenólica (que contiene las proteínas) la mezcla fue centrifugada. Una vez separados los ácidos nucleicos, se añadió propanol para precipitar el RNA de la muestra y se centrifugó para poder separar el RNA del líquido rico en DNA. El pellet de RNA fue lavado con etanol al 70% y finalmente se volvió a disolver en agua tratada con DEPC (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EEUU).

Las muestras procesadas con este método se analizaron con un espectrofotómetro (Cecil Instruments Limited, Cambridge, Reino Unido) (**Figura 11**) para determinar su pureza y concentración. La pureza se determinó como el ratio de absorbancia a 260 y 280nm de la muestra diluida en tampón Tris-EDTA (TE); una ratio entre 1,8 y 2,1 se consideró como pureza adecuada. La concentración se determinó a través de la siguiente fórmula:

$c = \epsilon \cdot A_{260nm} \cdot L \cdot \text{Factor dilución}$; donde c es la concentración de RNA en $\mu\text{g/mL}$, ϵ es el coeficiente de extinción del RNA en agua ($40\mu\text{g/mL}\cdot\text{cm}$), A es la absorbancia a 260nm de longitud de onda, L es la longitud del paso de luz (1 cm) y el factor de dilución es 1/250. El RNA fue conservado a -25°C hasta ser utilizado.



Figura 10. Sonicador Sonifier®150 de Branson.



Figura 11. Espectrofotómetro.



Figura 12. Columna con filtro del kit RNeasy® de Qiagen.

3.2. Extracción RNA. Método en columna RNeasy® de Qiagen

Para extraer el RNA con el método en columna RNeasy® (Qiagen, Hilden, Alemania), el tejido machacado fue introducido en una solución con mercaptoetanol al 1% para desnaturalizar todas las proteínas de la muestra, se homogenizó en frío con un sonicador Sonifier®150 y se centrifugó para separar la fase acuosa con los ácidos nucleicos de los restos de tejido.

Entonces se precipitó el material genético de la muestra con etanol al 70% y se realizaron varios lavados y filtrados en una columna (Figura 12). También se eliminaron las trazas de DNA genómico incubando las muestras con DNAsa en la misma columna. Finalmente se eluyó el RNA en agua tratada con DEPC. La concentración y pureza de estas muestras fue medida con un espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000

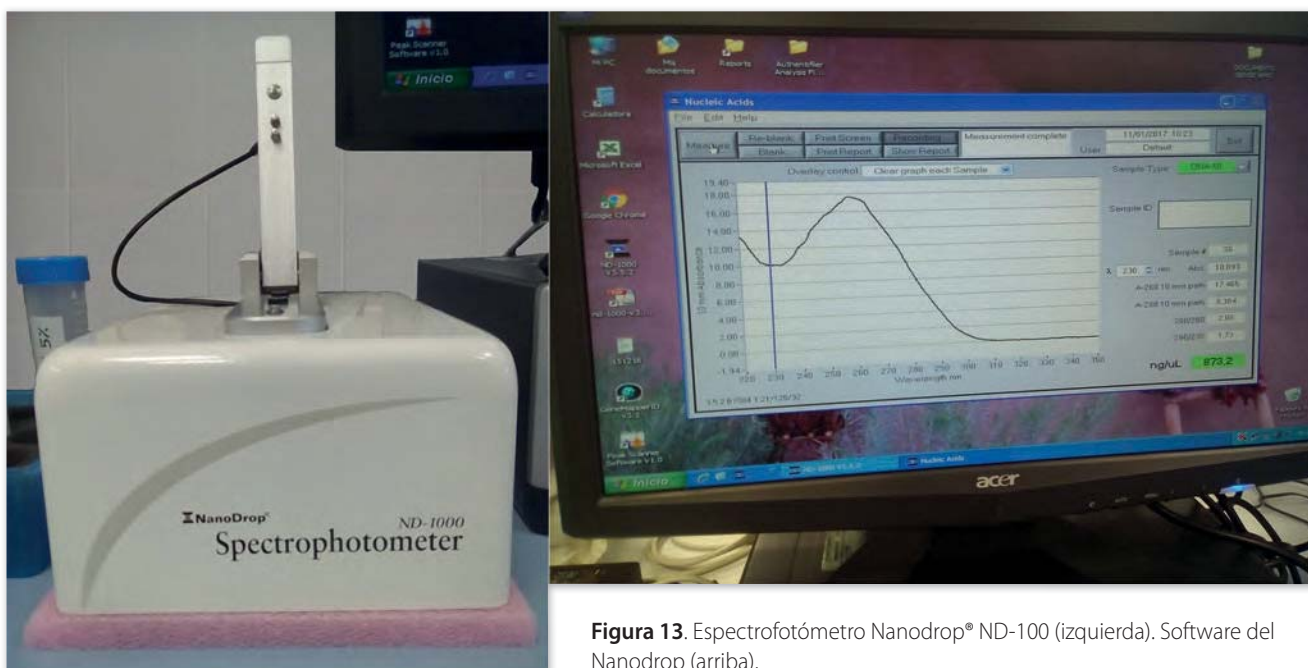


Figura 13. Espectrofotómetro Nanodrop® ND-100 (izquierda). Software del Nanodrop (arriba).

(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EEUU) (**Figura 13**). Un ratio de pureza de entre 1,8 y 2,1 se consideró adecuado. El RNA fue conservado a -25°C hasta ser utilizado.

3.3. Tratamiento con DNAsa

El RNA extraído con el método del Trizol[®] fue tratado con DNAsa I recombinante libre de RNAsa (Roche, Basilea, Suiza). El tratamiento se llevó a cabo con 10 μg de RNA y la reacción se detuvo añadiendo 2 μL de EDTA y poniendo la muestra a 95°C .

3.4. Retrotranscripción

Todas las muestras fueron retrotranscritas con el kit *First Strand Transcriptor* (Roche, Basilea, Suiza). El material de partida fue 1 μg de RNA, se utilizaron hexámeros aleatorios como encebadores de la retrotranscripción. Las muestras se pusieron a 65°C antes de retrotranscribir para eliminar las estructuras secundarias del RNA. Una vez realizada la retrotranscripción se inactivó la reacción poniendo la muestra a 95°C . El DNA complementario (cDNA) se diluyó en agua de PCR con un factor 1/10 y se congeló hasta ser utilizado a -25°C .

3.5. RT-qPCR

La PCR cuantitativa se realizó en un termociclador LightCycler[®] 2.0 (Roche, Basilea, Suiza) (**Figura 14**) con el kit LightCycler[®] Taqman[®] Master (Roche, Basilea, Suiza). El programa de amplificación de la PCR constaba de 10 minutos de *hot-start* a 95°C para activar la DNA polimerasa y asegurarse que todo el cDNA se encuentra desnaturalizado; después se realizaban entre 30 y 50 ciclos de amplificación que incluían la fase de desnaturalización a 95°C , la fase de unión o alineamiento a la temperatura adecuada para cada experimento (entre $63-65^{\circ}\text{C}$) y la fase de elongación a 72°C .



Figura 14. Termociclador LightCycler[®] 2.0 de Roche.

El diseño de los encebadores y la elección de las sondas (**Tabla 2**) de entre la *Universal Probe Library* (UPL) se realizó a través del software Universal Probe Library System Assay Design (Roche, Basilea, Suiza) con los códigos RefSeq de la NCBI de los transcritos que se buscaba amplificar. El diseño de los experimentos se realizó con *intron spanning* para evitar la amplificación de DNA genómico.

Cada PCR incluía los controles de contaminación de la PCR y de la retrotranscripción, así como también controles de amplificación de DNA genómico de cada muestra sin retrotranscribir. Se estudiaron cuatro réplicas de cada muestra y se utilizó Actina (ACTBh) como gen de referencia para la cuantificación relativa.

Gen	UPL	Encebadores
β -actina (ACTBh)	64	Left: 5' ccaaccgcgagaagatga 3'
		Right: 5' tccatcacgatgccagtg 3'
TRP subfamily V member 1 (TRPV1)	41	Left: 5' cagctacagtgagatgcttttctt 3'
		Right: 5' atggaagccacatactccttg 3'
TRP subfamily A member 1 (TRPA1)	32	Left: 5' tcacatgagctagcagactattt 3'
		Right: 5' gagagcgtccttcagaatcg 3'
TRP subfamily M member 8 (TRPM8)	41	Left: 5' ccaagaacttcgccctga 3'
		Right: 5' ctcccgtgagaatccaagc 3'
Acid sensing ion channel 3 (ASIC3)	43	Left: 5' ccttggtggcctgagaac 3'
		Right: 5' cccatgccaccctagta 3'

Tabla 2. Encebadores y sondas de la *Universal Probe Library* (UPL) utilizadas para el estudio de expresión de los receptores con RT-qPCR.

4. Métodos farmacodinámica in vitro

El estudio de la farmacodinámica de los diferentes agonistas de receptores TRP se realizó en células PC-3, que expresan de forma natural el receptor TRPV1, de adenocarcinoma de próstata de hombre caucásico provenientes de la colección europea de cultivos celulares autenticados (ECACC) con número de catálogo 90112714. Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con un 10% de suero fetal bovino, 100UI/mL de penicilina G, 100 μ g/mL de estreptomycin y 0,25 μ g/mL de anfotericina B (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EEUU). Las células se incubaron a una temperatura de 37°C y con un 5% de CO₂. Se realizaba un pase con medio fresco cada 3-4 días y para los estudios de farmacodinámica sólo se utilizaron células con menos de 25 pases. Un día antes de los experimentos, las células se pasaron a placas de 35mm de diámetro con portaobjetos de cristal.

Antes del experimento, las células fueron incubadas durante 45 minutos a temperatura ambiente en medio extracelular (140mM NaCl, 4,8mM KCl, 1mM MgCl₂·6H₂O, 1,8mM CaCl₂·2H₂O, 10mM glucosa y 10mM HEPES; pH 7) con 3,64mM del indicador fluorescente de calcio Fluo-4 AM de Molecular Probes® (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EEUU). Entonces se cubrió el portaobjetos con un cubreobjetos y la preparación se introdujo en una cámara de visualización donde estaba perfundida continuamente con medio extracelular.

Las células se visualizaron con un equipo IX-FLA (Olympus Biosystems, Heidelberg, Alemania) conectado a un microscopio Olympus IX70 con lentes de 20 aumentos (Olympus, Tokio, Japón). En cada experimento las células se exponían a capsaicina (Tocris, Bristol, Reino Unido), piperina (Sigma Aldrich, St Louis, MO EEUU) o salsa de capsaicinoides (McIlhenny Co, Avery Island, LA EEUU) durante 10 segundos y, o se dejaban 10 minutos de reposo para volver a exponerlas al mismo agonista y comprobar el efecto de desensibilización o, durante esos 10 minutos, se incubaban 5 minutos con SB366791 (Tocris, Bristol, Reino Unido), un antagonista específico del receptor, para comprobar la especificidad del efecto de los agonistas en una segunda exposición. Al finalizar el experimento se añadía ionomicina 10 μ M (Sigma Aldrich, St Louis, MO EEUU) al cultivo para introducir calcio en la células y obtener el máximo de fluorescencia. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (18-20°C).

Las secuencias se grabaron durante 40 segundos a 2,5Hz; la emisión de fluorescencia del Fluo-4 AM en contacto con el calcio intracelular se midió tras la adición de los agonistas a 488nm de longitud de onda. Las imágenes se analizaron con el programa Cell (Olympus Biosystems, Heidelberg, Alemania). Se estudió la fluorescencia total en función del tiempo en áreas delimitadas en el interior de las células, llamadas regiones de interés (ROI). Se seleccionaron 10 ROI de cada preparación y se tomó como fluorescencia máxima ($F_{\text{máx}}$) la fluorescencia obtenida tras añadir la ionomicina. Se consideró fluorescencia basal la fluorescencia obtenida en ROI donde no había ninguna célula. El incremento de fluorescencia (ΔF) se calculó como la diferencia entre el promedio entre la intensidad del pico de fluorescencia y las fluorescencias obtenidas dos fotogramas antes y después, y la fluorescencia inicial, calculada como el promedio de fluorescencia durante los primeros 10 fotogramas (**Figura 15**).

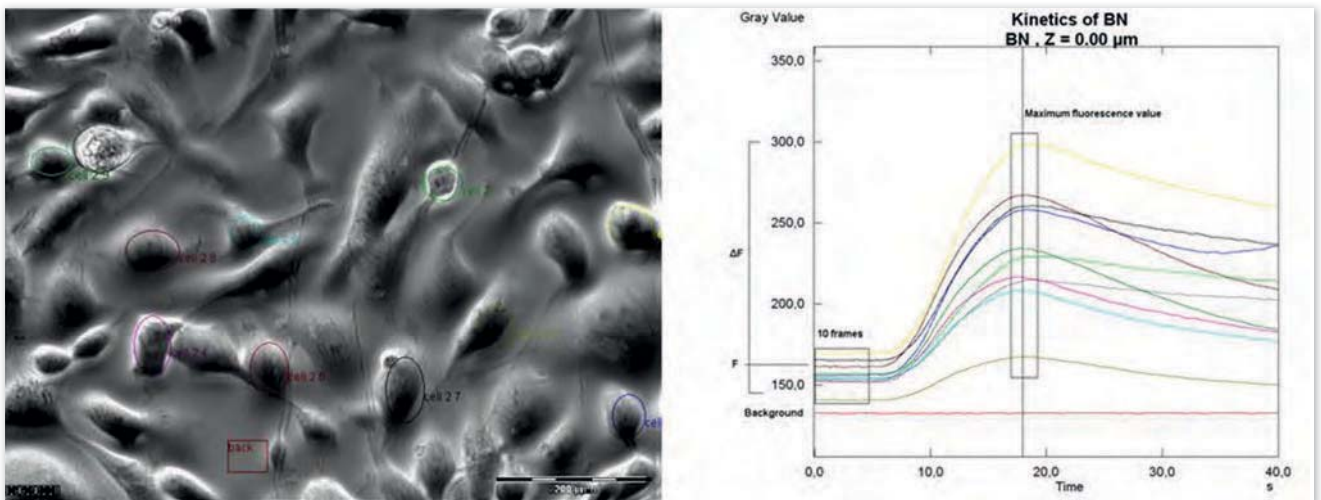


Figura 15. Ejemplo de campo con las regiones de interés (ROI) marcadas (izquierda). Ejemplo de gráfica con el cambio de intensidad de la fluorescencia en cada uno de los ROIs (derecha).

5. Estudios clínicos en pacientes con disfagia orofaríngea

Para los estudios que conforman el estudio de comparación del efecto de los distintos tratamientos farmacológicos de la disfagia se reclutaron pacientes que acudían a la consulta externa de DO del Hospital de Mataró, que da asistencia a una población de más de 250000 habitantes correspondientes al Maresme Central, en la provincia de Barcelona. Los pacientes derivados a nuestra

consulta externa con disfagia asociada a la edad, a un ictus o a enfermedades neurodegenerativas fueron evaluados con el método de evaluación clínica volumen-viscosidad (MECV-V) y, aquellos con alteraciones de la seguridad, fueron informados del estudio e invitados a participar en él previa firma del consentimiento informado.

El Comité de Ética para la Investigación Clínica del centro aprobó los protocolos de todos estos estudios con los códigos 32/08 (capsaicinoides y almidón), 22/09 (piperina) y 05/13 (mentol) (Anexo 2). Además, los estudios se realizaron de acuerdo a la Declaración de Helsinki y sus sucesivas enmiendas. Los estudios se encuentran en el registro de ensayos clínicos del Departamento de Salud de EEUU (ClinicalTrials.gov) con los códigos ISRCTN31088564 (estudio con capsaicinoides y estudio con textura pudín alcanzado con almidón modificado), NCT01383694 (estudio con piperina) y NCT03050957 (estudio con mentol).

Los criterios de inclusión para estos estudios eran:

1. Tener más de 18 años
2. Presentar dificultad para tragar asociada al envejecimiento y/o a enfermedades neurológicas (enfermedades neurodegenerativas o neurológicas no progresivas)
3. Haber recibido información del estudio
4. Haber firmado el consentimiento informado

Los criterios de exclusión para estos estudios eran:

1. Pacientes que por cualquier idiosincrasia o por presentar alergia a alguno de los productos utilizados según el protocolo (principalmente contraste yodado) no puedan participar en el estudio
2. Pacientes que padecen enfermedades respiratorias muy graves (que requieran aporte artificial de oxígeno) o que hayan sido intervenidos quirúrgicamente durante los tres meses previos a la participación en el estudio
3. Pacientes con antecedentes de alcoholismo severo o alguna otra adicción a drogas
4. Pacientes que estén participando o hayan participado en algún otro estudio clínico durante las 4 semanas previas a iniciar su participación en el presente estudio.

Se recogió la edad, el sexo, la etiología de la disfagia y la percepción propia de la severidad de los síntomas de la disfagia, a través del cuestionario de deglución de Sydney (SSQ) (163), de todos los pacientes que participaron en los distintos subestudios.

6. Método instrumental de estudio de la deglución

Para estudiar los signos de seguridad y eficacia de la deglución y poder analizar los tiempos de la respuesta motora orofaríngea y la cinética del bolo en los pacientes que participaron en el estudio de comparación, se utilizó la técnica instrumental de estudio de la deglución conocida como videofluoroscopia (VFS). La VFS consiste en registrar cómo degluten los pacientes diferentes bolos de fluido radiopaco hidrosoluble de volumen y viscosidad conocidos usando un aparato de rayos X. Para obtener las viscosidades néctar y pudín se utilizó el espesante de almidón modificado Resource® (Nestlé, Vevey, Suiza).

Los estudios clínicos que incluían la sensitización con estimulantes químicos naturales siguieron el siguiente esquema (**Figura 16**):

1. Una primera serie control de volúmenes 5, 10 y 20mL con viscosidad néctar (entre 51 y 350mPa·s) registrada con rayos X.
2. Sensitización con dos bolos de 5mL con viscosidad néctar y suplementados con el estimulante de estudio, con 2 minutos de descanso entre bolos y sin registrar la deglución.
3. La serie T1 con volúmenes 5, 10 y 20mL con viscosidad néctar y suplementados con el estimulante de estudio se realizó 5 minutos después del último bolo de sensitización. Esta serie se realizó sin descanso entre bolos y registrando las degluciones con rayos X.
4. La serie T2 con volúmenes 5, 10 y 20mL con viscosidad néctar y suplementados con el estimulante de estudio se realizó 10 minutos después del último bolo de la serie T1. Esta serie se realizó sin descanso entre bolos y registrando las degluciones con rayos X.

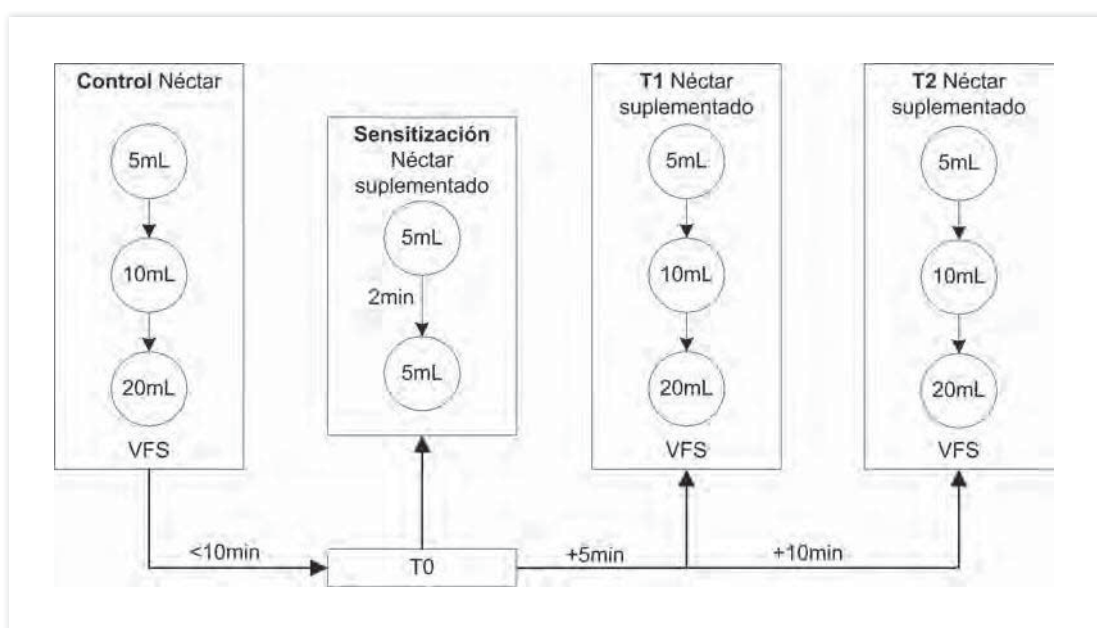
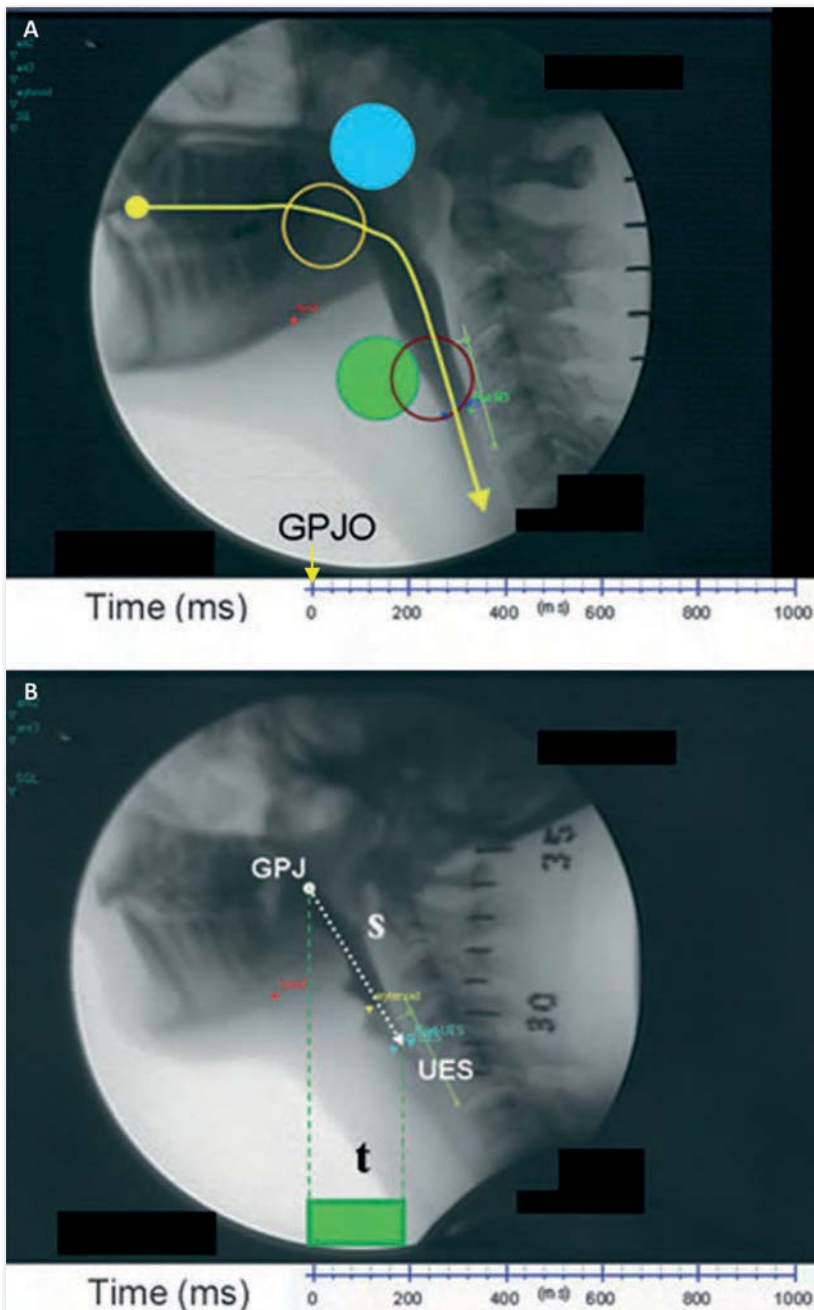


Figura 16. Esquema del protocolo de los ensayos clínicos con agonistas de receptores TRP.

Las imágenes de VFS se obtuvieron de cada paciente desde una proyección lateral que incluía la cavidad oral, la faringe, la laringe y el esófago cervical; el registro de estas imágenes se realizó con un intensificador Super XT-20 (Toshiba Medical Systems Europe, Zoetermeer, Holanda) y se grabó a 25 cuadros por segundo con una videocámara AG DVX-100B (Matsushita Electric Industrial Co, Osaka, Japón). Los siguientes signos videofluoroscópicos, los tiempos de la RMO y la cinética fueron analizados con el programa Swallowing Observer (Image and Physiology SL, Barcelona, España) (69,164):

1. **Signos videofluoroscópicos:** se analizó la presencia de residuos orales y residuos en los senos piriformes y la vallécula, englobados como residuos faríngeos, después de cada deglución dentro de los signos de alteración de la eficacia. Se analizó la entrada de parte del bolo en el vestíbulo laríngeo sin traspasar las cuerdas vocales como penetración laríngea antes, durante o después de la deglución como signo de alteración de la seguridad.
2. **RMO y cinética:** los tiempos de la RMO se obtuvieron en la deglución de 5mL para todas las series. Incluían los tiempos de apertura del sello glosopalatino (GPJO), el cierre del vestíbulo laríngeo y la apertura del esfínter esofágico superior (EES). Se calculó la velocidad final del



bolo a partir de las fórmulas del movimiento rectilíneo uniformemente acelerado y considerando que el bolo partía del reposo al inicio de la deglución; se utilizó la distancia entre el SGP y el EES y el tiempo transcurrido entre la apertura del SGP y la del EES (69,164) (Figura 17).

Figura 17. Análisis de la respuesta motora orofaríngea y la cinética del bolo. A) Respuesta motora orofaríngea, B) Cinética del bolo.

7. Métodos estadísticos y de análisis

7.1. Estudios de Biología Molecular

La cuantificación relativa respecto a β -actina (ACTBh) de la expresión de los receptores se realizó a través del método ΔC_p (165) con el *crossing point* (C_p) determinado durante la PCR cuantitativa. Se realizó una curva estándar de la amplificación de cada gen para comprobar que la eficacia de cada ensayo de PCR estuviera entre 1.8 y 2.0. Los resultados de expresión relativa se representan como el promedio \pm el error estándar. La expresión relativa de todas las regiones se comparó utilizando el test ANOVA para muestras no paramétricas (Kruskal-Wallis). Para comparar entre pares se utilizó la U de Mann-Whitney. Se consideró que un p-valor menor que 0.05 era estadísticamente significativo.

7.2. Farmacodinámica in vitro

Los datos de farmacodinámica de la capsaicina y la piperina se ajustaron en una curva concentración-respuesta a la ecuación de Hill. Los parámetros de la ecuación de Hill se representan como el promedio \pm el error estándar y se compararon con una T de Student para datos no apareados. Para analizar la desensibilización y el efecto de los antagonistas se utilizó la U de Mann-Whitney para datos no paramétricos. Se consideró que un p-valor menor que 0.05 era estadísticamente significativo.

7.3. Estudios clínicos

En el estudio comparativo del efecto de los distintos tratamientos farmacológicos de la disfagia, al comparar entre grupos, las variables categóricas se compararon con el test Chi cuadrado y las variables continuas se compararon utilizando el test ANOVA para muestras no paramétricas (Kruskal-Wallis) con un post-análisis por parejas (test de comparación múltiple de Dunn). Para comparar entre pares, se normalizó el efecto de cada tratamiento respecto a su propio control (% de cambio) y se utilizó la U de Mann-Whitney. Dentro de un mismo estudio, para estudiar el efecto de cada tratamiento respecto a su propio control se utilizó el test de McNemar para variables categóricas y el test de Wilcoxon para variables continuas. Se consideró que un p-valor menor que 0.05 era estadísticamente significativo y que intervalos de confianza no solapados para la odds ratio del test de McNemar indicaban efectos significativamente distintos.



RESULTADOS



CAPÍTULO 1

LOCALIZACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES SENSORIALES EN LA OROFARINGE

Todas las muestras estudiadas con los métodos de histología convencional provienen de hombres de edad media o avanzada que han sido intervenidos por un tumor de cabeza o cuello con un estadiaje generalmente precoz (pT1 N0) (**Tabla 1**).

Número de pacientes		6
Edad		64,50±2.72 (52-72)
Sexo (hombres)		6 (100%)
Motivo cirugía	Neoplasia maligna de faringe	2 (33,33%)
	Neoplasia maligna de laringe	2 (33,33%)
	Neoplasia maligna de lengua	1 (16,67%)
	Neoplasia maligna de amígdala	1 (16,67%)
Rango de estadiaje		pT1-3 N0-1 M0/x
Región de las muestras	Lengua	3
	Faringe	2
	Epiglotis	3

Tabla 1. Datos de las muestras utilizadas para realizar histología convencional.

Las muestras estudiadas con inmunohistoquímica y observadas a través de microscopía confocal para determinar la localización de los receptores sensoriales provienen mayoritariamente de hombres de edad media o avanzada que, en la mayoría de casos, han sido intervenidos por un tumor de cabeza o cuello con un estadiaje generalmente precoz (pT1-2 N0) (**Tabla 2**).

Número de pacientes		12
Edad		60,58±3.18 (33-78)
Sexo (hombres)		10 (83,33%)
Motivo cirugía	Neoplasia maligna de faringe	4 (33,33%)
	Neoplasia maligna de laringe	4 (33,33%)
	Neoplasia maligna de lengua	1 (8,33%)
	Neoplasia maligna de parótidas	1 (8,33%)
	Lesiones no neoplásicas	2 (16,67%)
Rango de estadiaje		pT1-3 N0-2 M0/x
Región de las muestras	Lengua	5
	Faringe	2
	Epiglotis	2

Tabla 2. Datos de las muestras utilizadas para realizar inmunohistoquímica en confocal.

Las muestras estudiadas con RT-qPCR para determinar la expresión relativa de los receptores sensoriales provienen mayoritariamente de hombres de edad media o avanzada que, en la mayoría de casos, han sido intervenidos por un tumor de cabeza o cuello con estadiaje generalmente precoz (pT1-2 N0) aunque también hubo muestras de pacientes con tumor más avanzado (**Tabla 3**). La mayoría de estos pacientes eran fumadores (66,66%) y la mitad eran bebedores moderados o severos.

Número de pacientes		28
Edad		64,04±1,84 (51-83)
Sexo (hombres)		23 (82,14%)
Motivo cirugía	Neoplasia maligna de faringe	5 (17,86%)
	Neoplasia maligna de laringe	11 (39,29%)
	Neoplasia maligna de lengua	1 (3,57%)
	Neoplasia maligna de amígdala	3 (10,71%)
	Lesiones no neoplásicas	8 (28,57%)
Rango de estadiaje		pT1-4 N0-2 M0/x

Tabla 3. Datos de las muestras utilizadas para realizar biología molecular.

1.1. Estructura de la mucosa orofaríngea

La mucosa de lengua (**Figuras 1.A y 1.B**) presenta una gruesa capa de tejido conectivo (□ en **Figura 1.A**) debajo de la cual están los músculos; esta capa de tejido conectivo está muy irrigada por múltiples vasos sanguíneos (⌘ en **Figura 1.A**), observados en hematoxilina eosina como compartimentos envueltos de endotelio y, en ocasiones, con eritrocitos en su interior. Un epitelio estratificado y paraqueratinizado (■ en **Figura 1.A**) recubre toda la mucosa lingual; desde las capas más profundas a las más superficiales se puede observar el *stratum basale*, formado por células epiteliales prismáticas y muy compactas justo por encima de la lámina basal, el *stratum spinosum*, formado por células epiteliales más cúbicas y menos compactadas, el *stratum granulosum*, formado por células epiteliales aplanadas y con gránulos sólo visibles a mayor aumento (❖ en **Figura 1.B**) y el *stratum corneum*, formado por células que pueden haber perdido, o no, el núcleo y que en tinción de hematoxilina eosina presenta un color más rojizo. El epitelio lingual presenta invaginaciones causadas por las papilas filiformes; cuando estas papilas están orientadas de forma oblicua al corte histológico se pueden observar seccionadas (♦ en **Figura 1.A**).

La mucosa de la faringe (**Figuras 1.C y 1.D**) también presenta una gruesa capa de tejido conectivo (□ en **Figura 1.C**), que puede estar ocupada en gran parte por estructuras glandulares (● en **Figuras 1.C y 1.D**); también en la faringe esta capa presenta una gran irrigación tanto del tejido conectivo como de las glándulas (⌘ en **Figuras 1.C y 1.D**). Un epitelio estratificado y no queratini-

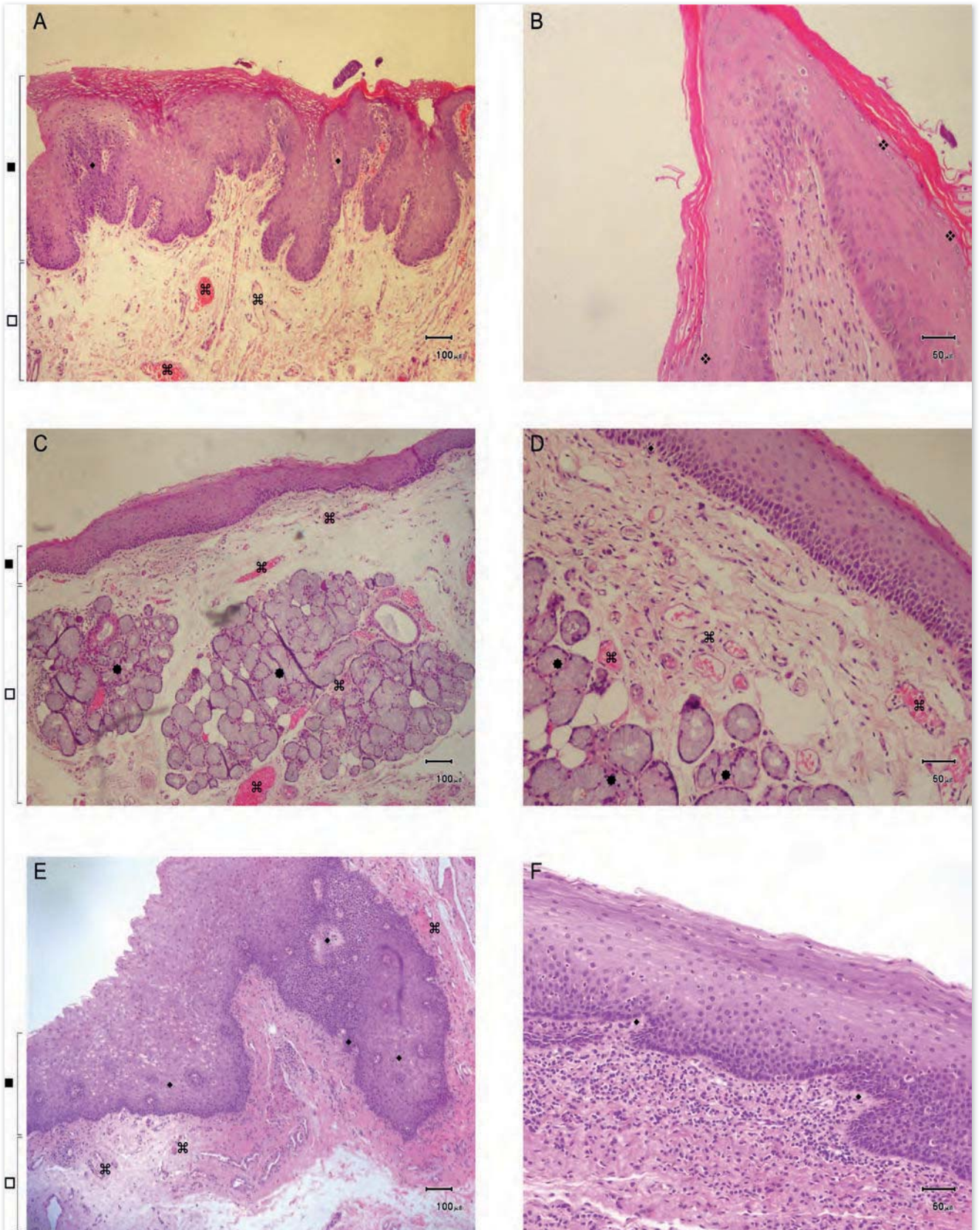


Figura 1. Estructura de la mucosa orofaríngea humana observada con hematoxilina eosina a 100 y 200x.

A) Mucosa de lengua observada a 100x, B) Detalle de una papila filiforme de la lengua observada a 200x, C) Mucosa de faringe observada a 100x, D) Mucosa de faringe observada a 200x, E) Mucosa de la cara lingual de la epiglotis observada a 100x, F) Mucosa de la cara lingual de la epiglotis observada a 200x.

zado (■ en **Figuras 1.C**), mucho más delgado que en la lengua, recubre toda la mucosa faríngea; desde las capas más profundas a las más superficiales este epitelio presenta la capa basal, formada por células epiteliales prismáticas y muy compactas justo por encima de la lámina basal, la capa intermedia, formada por células epiteliales más cúbicas y menos compactadas, y la capa superficial, formada por células epiteliales aplanadas y que generalmente conservan su núcleo. A diferencia de la lengua, en la faringe no hay papilas filiformes, aunque sí se pueden encontrar pequeñas invaginaciones de la lámina basal (♦ en **Figura 1.D**) similares a las encontradas en el epitelio de la piel para fijarse a la dermis.

La mucosa de la cara lingual de la epiglotis (**Figuras 1.E y 1.F**) presenta también una gruesa capa de tejido conectivo (□ en **Figura 1.E**) debajo del cual se encuentra el cartílago; esta capa de tejido conectivo también presenta una importante irrigación (⌘ en **Figura 1.E**). Un epitelio estratificado y no queratinizado (■ en **Figura 1.E**) similar al de la faringe recubre toda la mucosa en la cara lingual de la epiglotis; este epitelio también puede presentar invaginaciones similares a las encontradas en el epitelio de la piel para fijarse a la dermis y, en caso que éstas sean oblicuas al corte histológico, se verán cortadas en sección dentro del epitelio (♦ en **Figuras 1.E y 1.F**).

1.2. Inervación de la mucosa orofaríngea

1.2.1. Lengua

La submucosa lingual presenta haces de fibras nerviosas (♦ en **Figuras 2.A y 2.B**) en las regiones más profundas (unos 300µm por debajo de la lámina basal) con un grosor de entre 20 y 30µm; las fibras que forman estos haces pueden presentar un grosor de entre 2 y 6µm. En zonas más próximas a la lámina basal (menos de 150µm de distancia), se pueden encontrar fibras nerviosas individuales (* en **Figuras 2.A y 2.B**) de menor grosor que pueden llegar a presentarse de forma abundante y reseguir de forma clara la lámina basal del epitelio. Aunque la inervación subepitelial es la más frecuente y abundante, también pueden encontrarse algunas fibras nerviosas que atraviesan la lámina basal y penetran el epitelio, recorriendo distancias cortas (unos 25µm) (◆ en **Figura 2.B** y * en **Figura 2.C**) o largas (hasta 175µm) (◆ en **Figura 2.C**) por entre las capas intermedias del epitelio.

En la mucosa lingual también pueden encontrarse estructuras sensoriales especializadas.

En las papilas filiformes pueden encontrarse estructuras corpusculares bulboides (♦ en **Figura 2.D**), que pueden corresponderse con corpúsculos de Meissner o bulbos de Krause, con unos 40µm de ancho y unos 35µm de largo, inervadas por una o más fibras nerviosas (* en **Figura 2.D**) que se subdividen y engrosan dentro del bulbo.

En los ápices de las papilas fungiformes pueden encontrarse botones gustativos (**Figuras 2.E y 2.F**) inervados por haces de fibras nerviosas (♦ en **Figura 2.E**). Los botones gustativos están formados por múltiples células dispuestas en forma de bulbo con un diámetro de unos 90µm. Las células más externas presentan núcleos pequeños y alargados (posiblemente células tipo I) y las más internas tienen núcleos más grandes y circulares (posiblemente células tipo II y III). Alrededor del botón gustativo pueden encontrarse fibras nerviosas que penetran el epitelio y rodean el bulbo (◆ en **Figura 2.E y 2.F**). También pueden encontrarse una gran cantidad de fibras nerviosas que penetran el epitelio por el centro del bulbo y rodean las células con núcleos grandes. Las papilas fungiformes que albergan un botón gustativo también pueden presentar terminaciones nerviosas libres que inervan compartimentos separados de la papila (* en **Figura 2.F**).

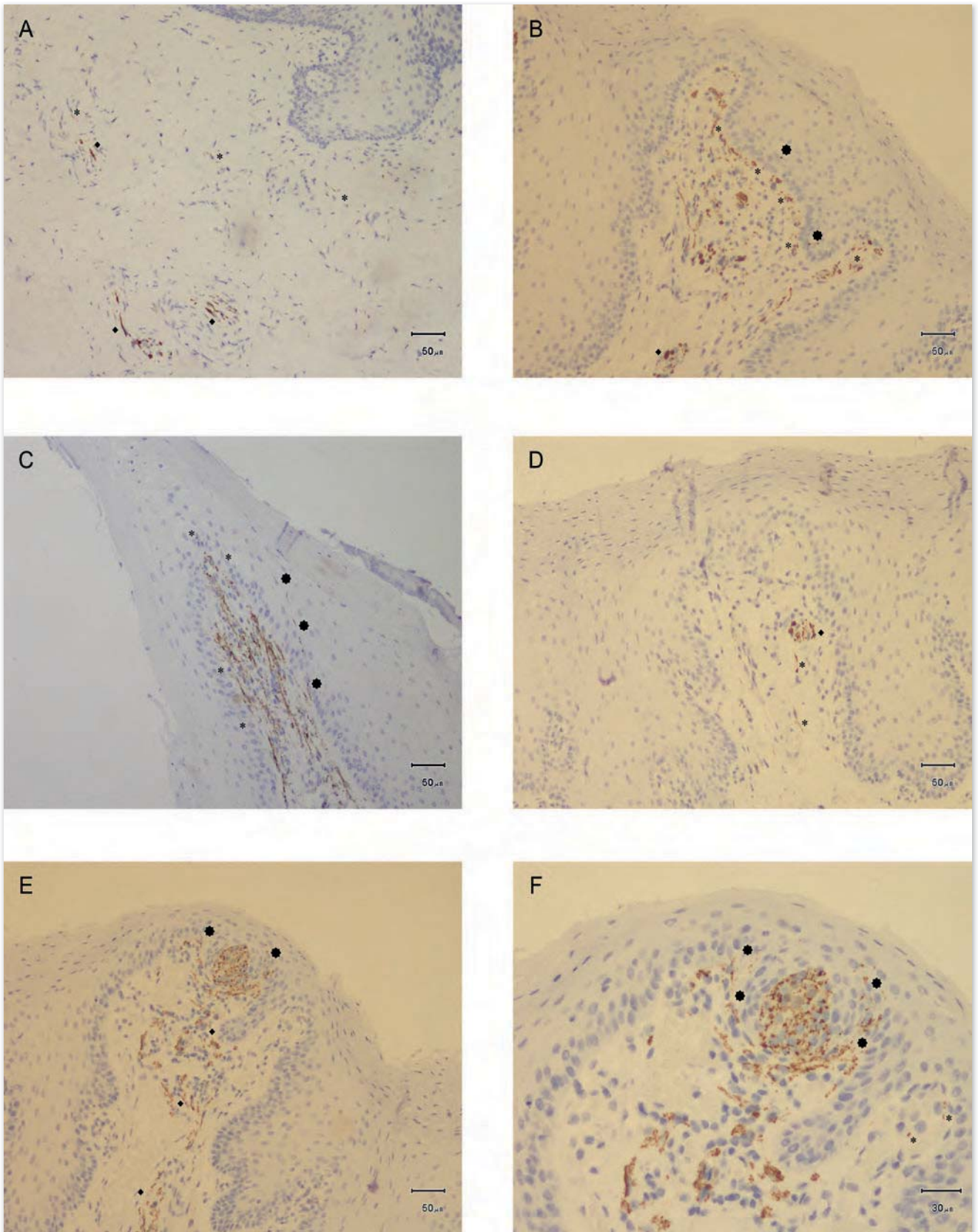


Figura 2. Inervación de la mucosa del cuerpo de la lengua humana observada mediante tinción con enolasa específica neural.

A) Inervación de la submucosa observada a 100x, B) Región densamente inervada por debajo del epitelio observada a 100x, C) Papila filiforme muy densamente inervada observada a 100x, D) Estructura corpuscular observada a 100x, E) Papila fungiforme con botón gustativo observados a 100x, F) Papila fungiforme con botón gustativo observados a 200x.

1.2.2. Faringe

En la mucosa faríngea se pueden encontrar fibras nerviosas que viajan justo por debajo de la lámina basal a lo largo de todo el epitelio (* en **Figura 3**), en mayor o menor densidad. En algunos puntos, estas fibras pueden atravesar la lámina basal y penetrar la capa epitelial hasta unos 80 μ m de distancia desde la lámina basal (◆ en **Figuras 3.B, 3C y 3D**).

En la submucosa, las glándulas encontradas en la capa de tejido conectivo también pueden presentar inervación (en **Figura 3.B**).

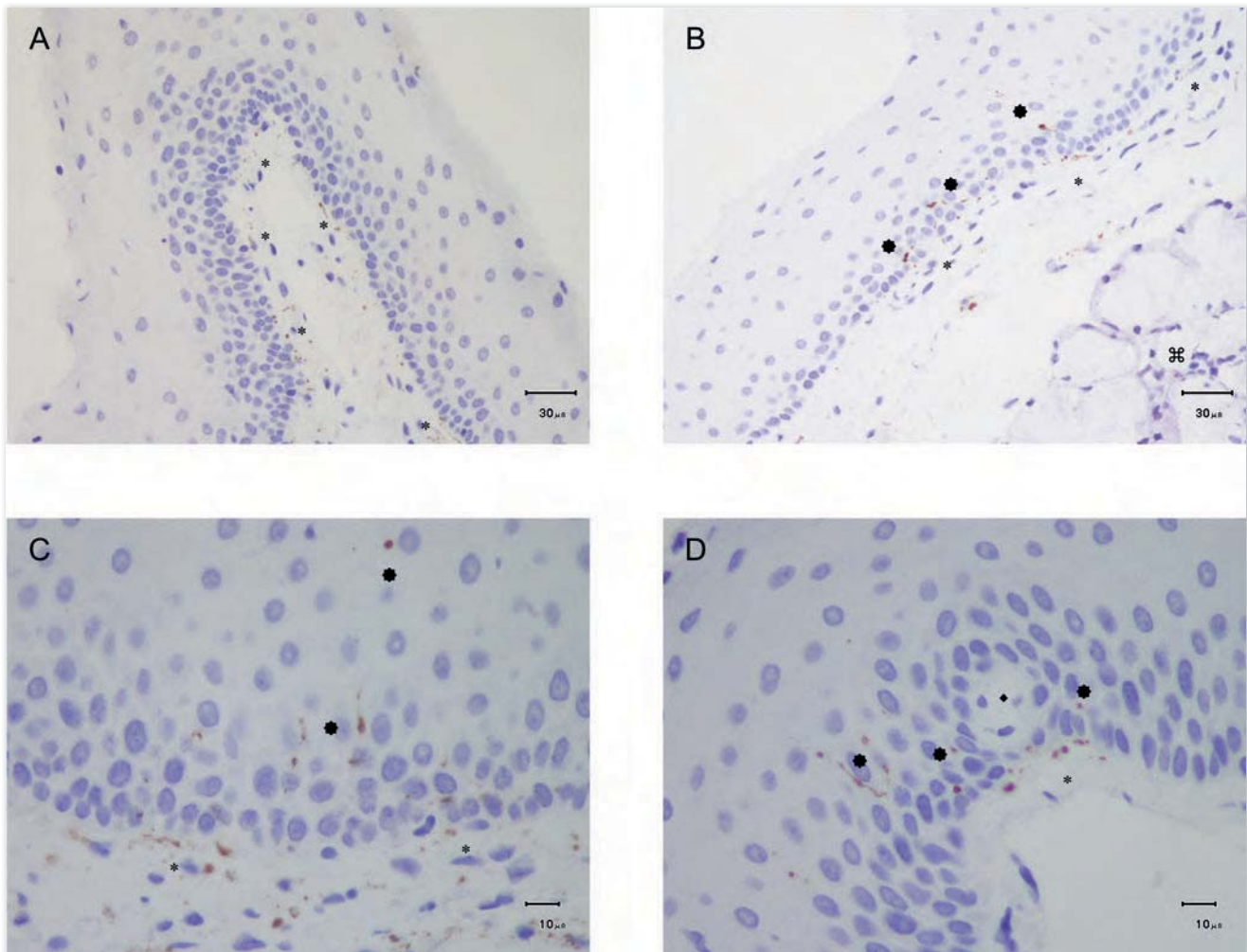


Figura 3. Inervación de la mucosa de la pared posterior faríngea humana observada mediante tinción con enolasa específica neural. A) Inervación de la mucosa observada a 200x, B) Inervación de la mucosa y de una glándula observada a 200x, C) Región densamente inervada observada a 400x, D) Detalle de una invaginación de la lámina basal observada a 400x.

1.2.3. Epiglotis

En las regiones más profundas de la mucosa de la cara lingual de la epiglotis, a unos 300 μ m de distancia del epitelio, circulan gruesos haces de hasta 100 μ m de grosor de fibras nerviosas (◆ en **Figura 4.A**); las fibras que forman estos haces pueden ser de más de 7 μ m de diámetro. Más próximo al epitelio se pueden encontrar fibras nerviosas y haces más finos (* en **Figuras 4.A, 4.B y 4D** y ◆ en **Figuras 4.B y 4D**); estas fibras pueden ser de hasta 10 μ m de diámetro en regiones un poco más profundas (unos 150 μ m desde la lámina basal) o mucho más finas a medida que se aproximan al epitelio.

Al igual que en otras regiones de la orofaringe, se pueden encontrar múltiples fibras nerviosas justo por debajo de la lámina basal (* en **Figuras 4C** y **4D**). Algunas de estas fibras nerviosas pueden atravesar la lámina basal y penetrar el epitelio hasta 100 μ m desde la lámina basal (◆ en **Figuras 4C** y **4D**). También se pueden encontrar acumulaciones de fibras nerviosas que atraviesan la lámina basal para cubrir pequeñas agrupaciones de células epiteliales de la capa basal; éstas podrían ser células de Merkel (◆ en **Figura 4C**).

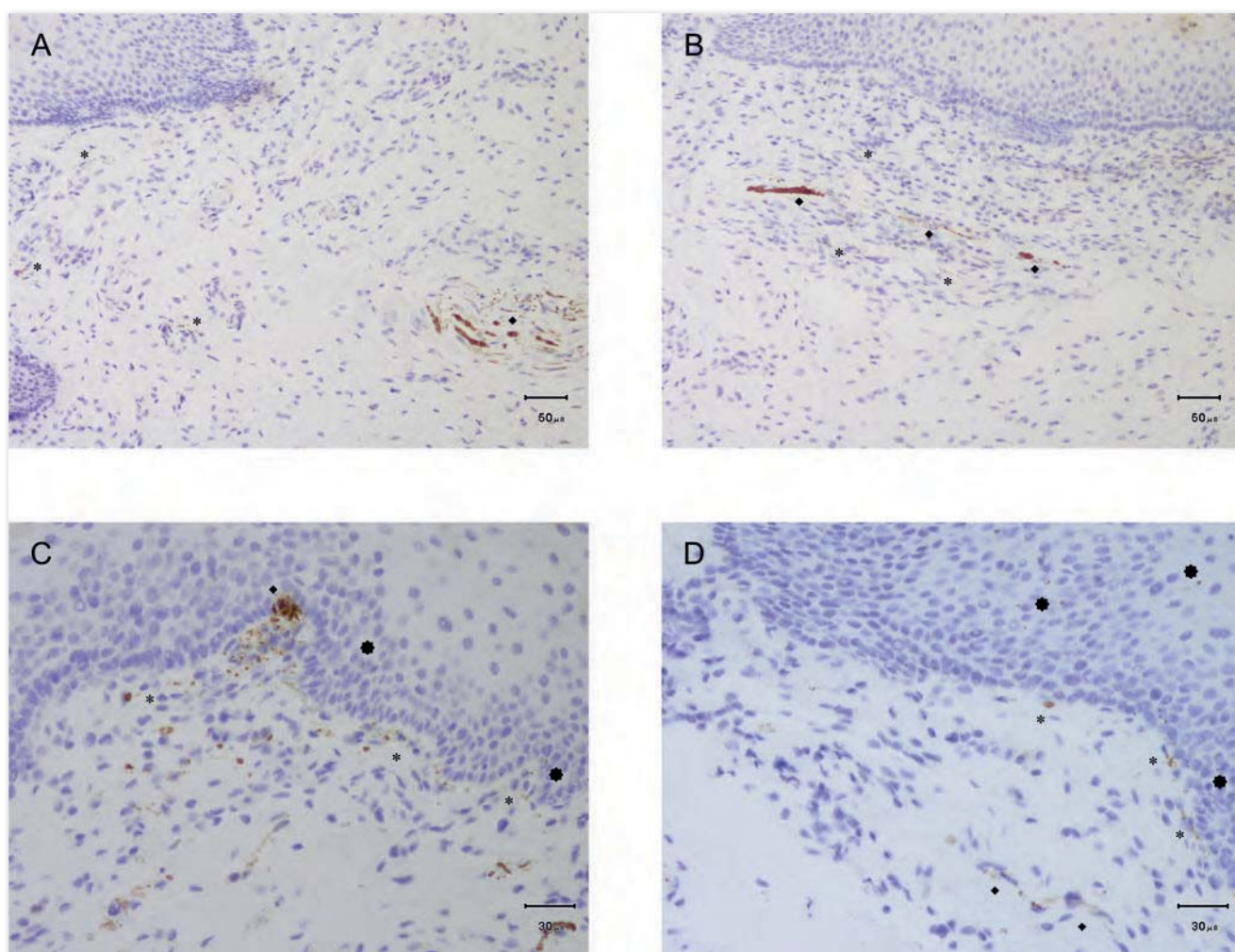


Figura 4. Inervación de la mucosa de la cara lingual de epiglotis humana observada mediante tinción con enolasa específica neural. A) Inervación de región profunda de la mucosa observada a 100x, B) Inervación de la mucosa observada a 100x, C) Región inervada por debajo del epitelio observada a 200x, D) Inervación de la mucosa observada a 200x.

1.3. Localización y expresión de TRPV1, TRPA1, TRPM8 y ASIC3

(Ver anexo 3)

Mediante el uso de técnicas de biología molecular e inmunohistoquímica hemos estudiado la localización y expresión de los receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8 y ASIC3 en muestras de mucosa orofaríngea humana. Las técnicas de biología molecular se han dirigido a la cuantificación del mRNA expresado en las regiones de interés. Las técnicas de inmunohistoquímica se han dirigido a la localización de los receptores (proteínas) en estas regiones.

1.3.1. Localización TRPV1

El marcaje de TRPV1 en mucosa lingual se concentra sobre la membrana de las células del epitelio, de forma bastante homogénea e intensa en el *stratum spinosum*, mientras que en las capas más superficiales, el *stratum granulosum* y el *stratum corneum*, el marcaje es mucho más débil. En las papilas filiformes delineadas por el *stratum basale* (♦ en **Figuras 5.A** y **5.B**) también se puede observar un marcaje más débil. Por debajo de la lámina basal no se encuentra marcaje claro.

El marcaje de TRPV1 en la mucosa faríngea se encuentra principalmente sobre la membrana de las células de las capas basal e intermedia del epitelio, mientras que en la capa superficial el marcaje des-

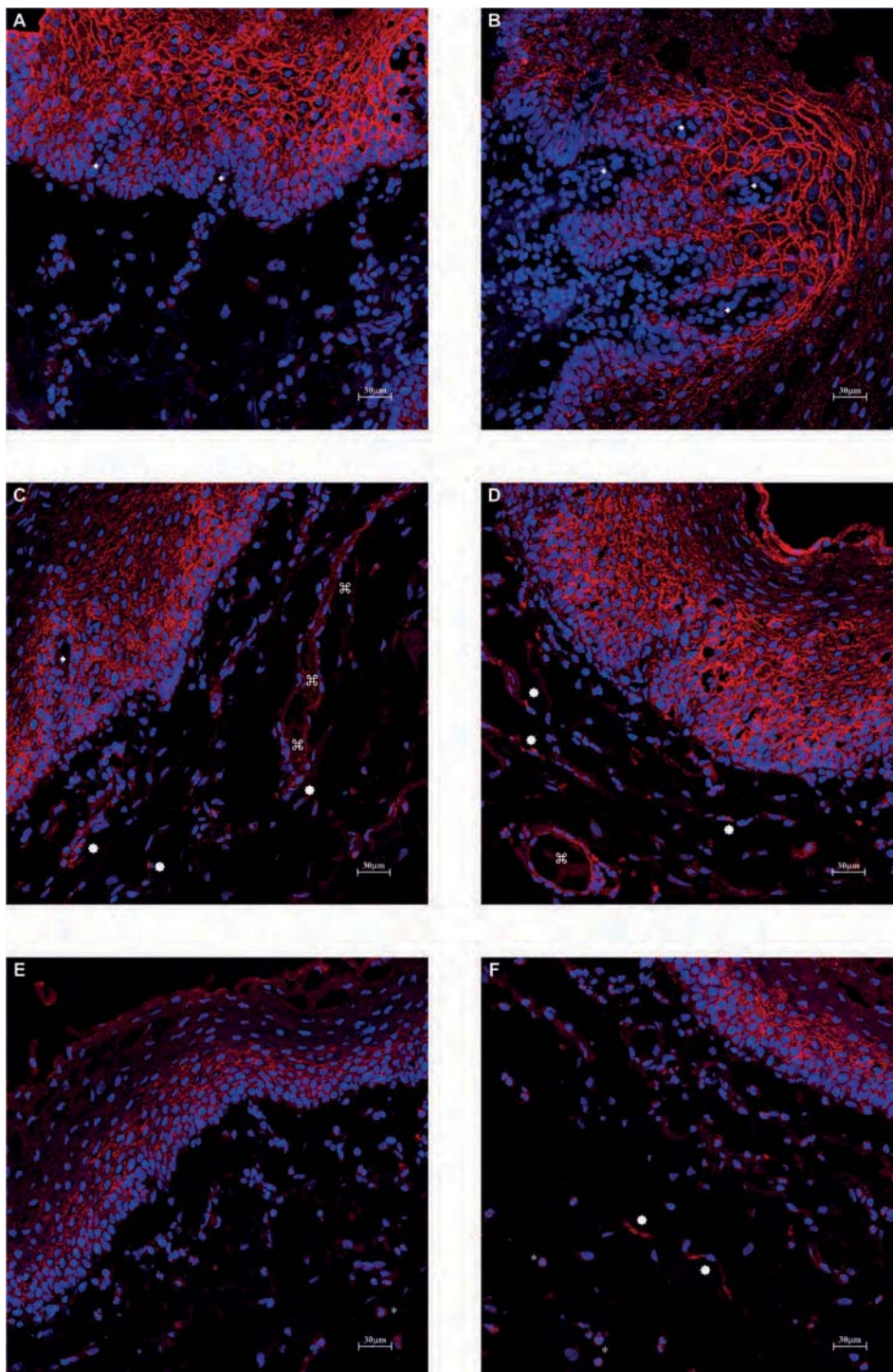


Figura 5. Localización de TRPV1 (rojo) en orofaringe humana. Preparaciones de IHC por fluorescencia observadas en microscopio confocal con el objetivo de 40x. A) Marcaje de TRPV1 en el epitelio de mucosa lingual, B) Marcaje de TRPV1 en papilas filiformes de la lengua, C) Marcaje de TRPV1 en el epitelio de mucosa faríngea, D) Marcaje de TRPV1 en la mucosa faríngea, E) Marcaje de TRPV1 en el epitelio de la mucosa de la epiglotis, F) Marcaje de TRPV1 en la mucosa de la epiglotis.

aparece prácticamente del todo. Por debajo del epitelio se puede encontrar también marcaje puntual hasta a unos 120-150 μm de distancia de la lámina basal (✪ en las **Figuras 5.C y 5.D**), algunos próximos o incluso delineando los vasos sanguíneos que irrigan la submucosa (⌘ en las **Figuras 5.C y 5.D**); estos marcajes podrían corresponderse a fibras nerviosas sensoriales.

El marcaje de TRPV1 en la mucosa de la cara lingual de la epiglotis es en general más tenue en las membranas de las células epiteliales; al igual que en faringe, el marcaje en epitelio se encuentra principalmente sobre la capa basal e intermedia. Por debajo del epitelio se encuentra marcaje sobre fibras nerviosas sensoriales (✪ en **Figura 5.F**) de unos 3 μm de grosor que viajan en paralelo al epitelio a unos

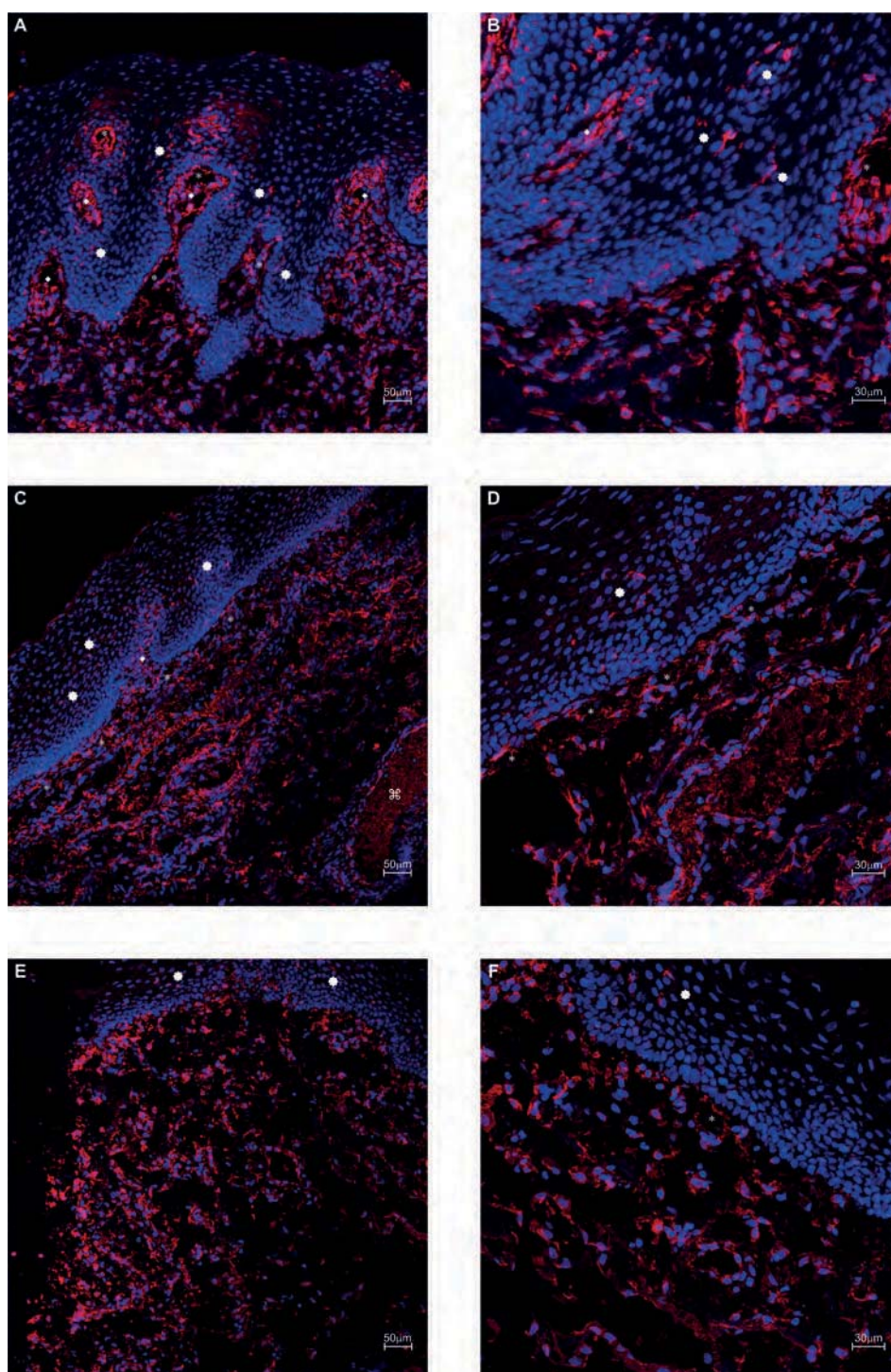


Figura 6. Localización de TRPA1 (rojo) en orofaringe humana. Preparaciones de IHC por fluorescencia observadas en microscopio confocal con los objetivos 20x y 40x. A) Marcaje de TRPA1 en papilas filiformes de la lengua observadas con el objetivo de 20x, B) Marcaje de TRPA1 en lengua observado con el objetivo de 40x, C) Marcaje de TRPA1 en mucosa de faringe observado con el objetivo de 20x, D) Marcaje de TRPA1 en mucosa de faringe observado con el objetivo de 40x, E) Marcaje de TRPA1 en mucosa de epiglotis observado con el objetivo de 20x, F) Marcaje de TRPA1 en mucosa de epiglotis observado con el objetivo de 40x.

180µm de distancia de la lámina basal. Entre 200 y 300µm de distancia de la lámina basal se puede encontrar marcaje de TRPV1 en células de 10µm de diámetro y núcleo multilobulado (* en **Figuras 5.E y 5.F**) que pueden corresponderse a leucocitos neutrófilos o basófilos.

1.3.2. Localización TRPA1

El marcaje de TRPA1 en la mucosa lingual se encuentra principalmente por debajo de la lámina basal; en algunos casos en células, posiblemente fibroblastos, y en otros con morfología fibrilar, posiblemente fibras nerviosas sensoriales. Justo por debajo de las papilas filiformes (♦ en **Figuras 6.A y 6.B**), se pueden encontrar fibras nerviosas sensoriales (* en **Figuras 6.A y 6.B**). También se puede encontrar marcaje dentro del epitelio, ya sea en fibras nerviosas o marcando células en el *stratum spinosum* (◆ en **Figuras 6.A y 6.B**); en el caso de las células marcadas, podría tratarse de células de Langerhans.

El marcaje de TRPA1 en mucosa faríngea se encuentra principalmente por debajo del epitelio, en algunos casos en células, posiblemente fibroblastos, y en otros con morfología fibrilar, posiblemente fibras nerviosas sensoriales. Se pueden encontrar fibras nerviosas marcadas alrededor de los vasos sanguíneos que irrigan la submucosa (⌘ en **Figura 6.C**). También se encuentran fibras nerviosas justo por debajo de la lámina basal (* en **Figuras 6.C y 6.D**), resiguiéndola. Las fibras que se encuentran resiguiendo la lámina basal en las invaginaciones del epitelio (♦ en **Figura 6.C**) la penetran en algunos puntos. Dentro del epitelio también se observa marcaje tanto en células del *stratum spinosum*, posiblemente células de Langerhans, como con morfología fibrilar, posiblemente fibras nerviosas sensoriales (◆ en **Figuras 6.C y 6.D**).

El marcaje de TRPA1 en mucosa de la cara lingual de la epiglotis se encuentra principalmente por debajo del epitelio, en algunos casos en células, posiblemente fibroblastos, y en otros con morfología fibrilar, posiblemente fibras nerviosas sensoriales. Aunque con menor frecuencia que en otras regiones, justo por debajo de la lámina basal pueden encontrarse marcajes de morfología fibrilar, posiblemente fibras nerviosas sensoriales (* en **Figura 6.F**). Dentro del epitelio también observa marcaje en menor cantidad tanto en células del *stratum spinosum*, posiblemente células de Langerhans, como con morfología fibrilar, posiblemente fibras nerviosas sensoriales (◆ en **Figuras 6.E y 6.F**).

1.3.3. Localización TRPM8

El marcaje de TRPM8 en mucosa lingual se encuentra principalmente en las fibras nerviosas que la inervan, generalmente por debajo del epitelio. Puede encontrarse tanto en gruesos haces de fibras nerviosas (◆ en **Figura 7.A**) que recorren la submucosa, como en fibras nerviosas que se encuentran justo por debajo de la lámina basal (* en **Figura 7.A**); en ocasiones, estas fibras con TRPM8 pueden atravesar la lámina basal y penetrar en el *stratum basale* y el *stratum spinosum* del epitelio (◆ en **Figura 7.B**). También puede encontrarse marcaje de TRPM8 en estructuras corpusculares que se encuentran por debajo del epitelio (♦ en **Figura 7.A**); estas estructuras podrían ser bulbos de Krause.

El marcaje de TRPM8 en mucosa faríngea se encuentra principalmente en las fibras nerviosas que la inervan, generalmente por debajo del epitelio. Puede encontrarse en los haces de fibras nerviosas (◆ en **Figuras 7.C y 7.D**) que recorren la submucosa, así como también en las fibras nerviosas que inervan el endotelio de los vasos sanguíneos que la irrigan (⌘ en **Figuras 7.C y 7.D**). También en la faringe puede encontrarse marcaje de TRPM8 en estructuras corpusculares que se encuen-

tran por debajo del epitelio (♦ en **Figura 7.D**), que, al igual que en la lengua, podrían ser bulbos de Krause.

El marcaje de TRPM8 en mucosa de la cara lingual de la epiglotis, aunque menos abundante y menos intensa, se encuentra principalmente en las fibras nerviosas que la inervan, generalmente por debajo del epitelio. Puede encontrarse en los haces de fibras nerviosas (◆ en **Figuras 7.E** y **7.F**) que recorren la submucosa, así como también en fibras nerviosas que se encuentran justo por debajo de la lámina basal (* en **Figura 7.E**).

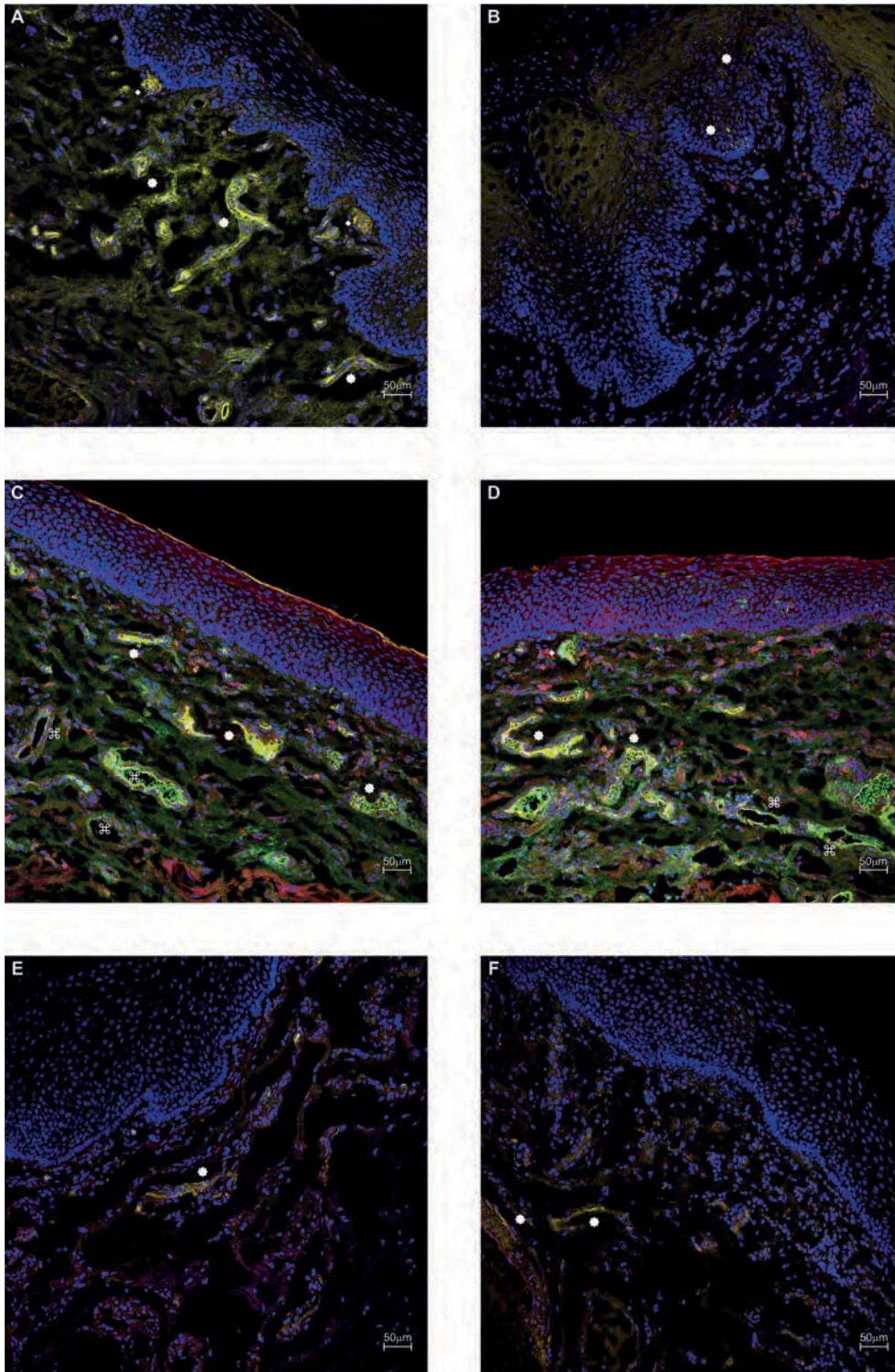


Figura 7. Localización de TRPM8 (rojo) y de NSE (verde) en orofaringe humana. Preparaciones de IHC por fluorescencia observadas en microscopio confocal con el objetivo de 20x. A y B) Marcaje de TRPM8 en mucosa lingual, C y D) Marcaje de TRPM8 en mucosa faríngea, E y F) Marcaje de TRPM8 en mucosa de la cara lingual de la epiglotis. La colocalización de TRPM8 y NSE se muestra en tono amarillento.

1.3.4. Localización de ASIC3

El marcaje de ASIC3 en mucosa lingual, aunque menos abundante e intenso que el resto de marcajes, se encuentra principalmente en las fibras nerviosas que la inervan, generalmente por debajo del epitelio. Los marcajes muestran colocalización de ASIC3 con las fibras que se encuentran justo por debajo de la lámina basal, resiguiendo las papilas filiformes (* en **Figuras 8.A** y **8.B**) así como también en las fibras que se dirigen hacia estas papilas (✱ en **Figuras 8.A** y **8.B**). También se encuentra en las fibras que inervan los vasos sanguíneos que irrigan la submucosa (⌘ en **Figuras 8.A** y **8.B**).

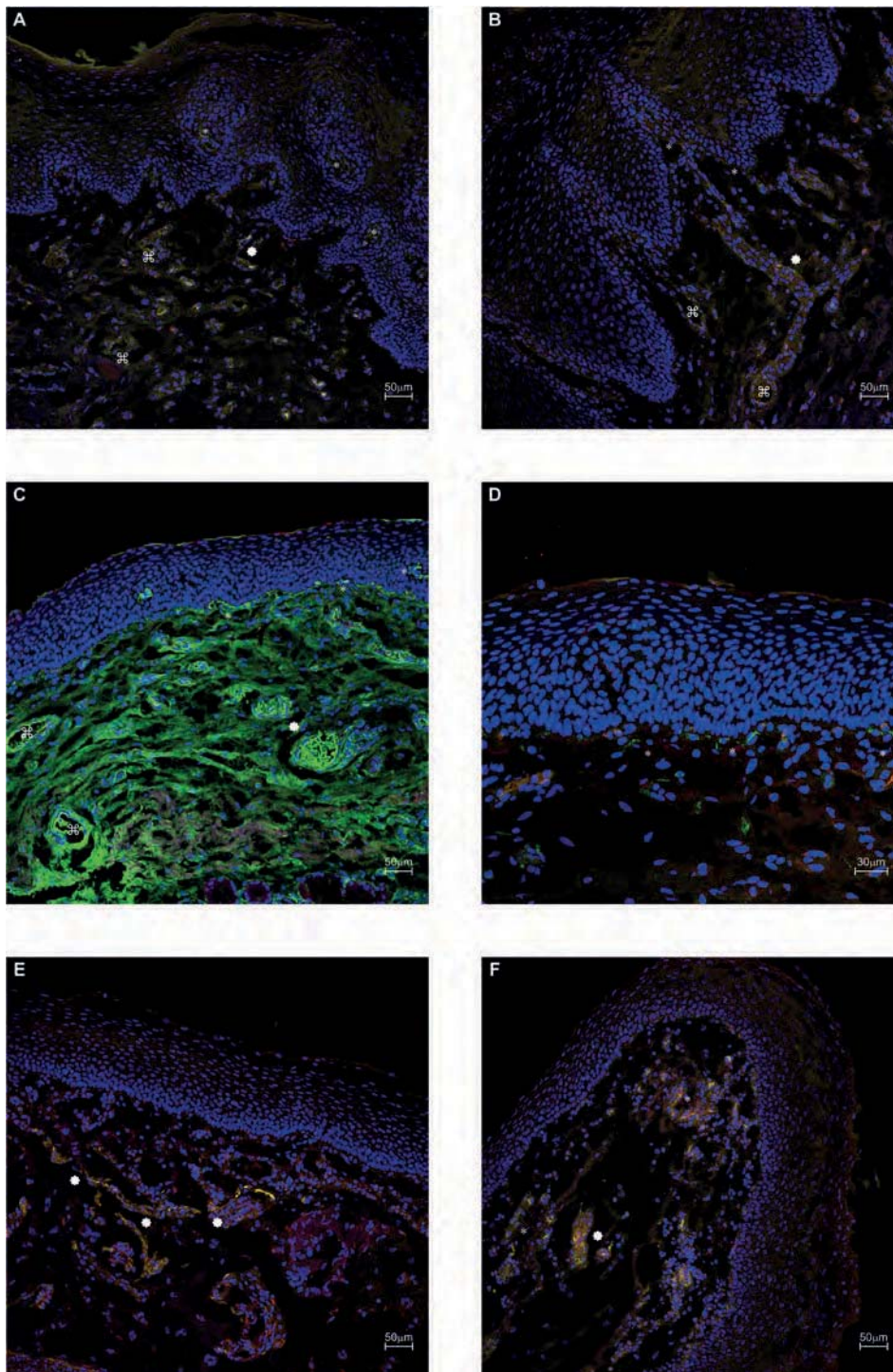


Figura 8. Localización de ASIC3 (rojo) y de NSE (verde) en orofaringe humana. Preparaciones de IHC por fluorescencia observadas en microscopio confocal con los objetivos de 20x y 40x. A y B) Marcaje de ASIC3 en mucosa lingual observado a 20x, C) Marcaje de ASIC3 en mucosa faríngea observado a 20x, D) Marcaje de ASIC3 en mucosa faríngea observado a 40x, E y F) Marcaje de ASIC3 en mucosa de la cara lingual de la epiglotis observado a 20x. La colocalización de ASIC3 y NSE se muestra en tono amarillento.

El marcaje de ASIC3 en mucosa faríngea es, en general, mucho menos abundante e intenso que en otras regiones. Aún y así, se puede encontrar en algunas de las fibras próximas a la lámina basal (* en **Figuras 8.C y 8.D**) así como también en algunas de las fibras de los haces que circulan por la submucosa (● en **Figura 8.C**). Las fibras que inervan los vasos sanguíneos que irrigan la submucosa (⌘ en **Figura 8.C**) también presentan marcaje de ASIC3.

El marcaje de ASIC3 en mucosa de la cara lingual de la epiglotis se encuentra principalmente en las fibras nerviosas que la inervan, generalmente por debajo del epitelio. Puede encontrarse principalmente en los haces de fibras nerviosas (● en **Figuras 8.E y 8.F**) que recorren la submucosa y en las fibras nerviosas que se aproximan a la lámina basal (* en **Figura 8.F**).

1.3.5. Expresión de TRPV1, TRPA1, TRPM8 y ASIC3

Los receptores TRPV1, TRPA1 y ASIC3 se expresan en las regiones inervadas por los nervios trigémino (NC V), glossofaríngeo (NC IX) y vago (CN X) de la orofaringe humana (**Figura 9**). En cambio, no se ha encontrado expresión de TRPM8 en muestras de mucosa orofaríngea humana.

La expresión relativa de TRPV1 respecto a ACTBh en orofaringe humana es $2,543 \times 10^{-4} \pm 2,117 \times 10^{-5}$ en el dorso del cuerpo de la lengua, $2,037 \times 10^{-4} \pm 2,582 \times 10^{-5}$ en los pilares posteriores, $2,167 \times 10^{-4} \pm 3,368 \times 10^{-5}$ en la pared lateral y posterior de la faringe y $1,659 \times 10^{-4} \pm 1,494 \times 10^{-5}$ en la cara lingual de la epiglotis. La expresión relativa de TRPV1 en lengua es significativamente superior a la de epiglotis de acuerdo a la comparación post-test de Dunn; los niveles de expresión en el resto de regiones no presentan diferencias significativas entre ellos.

La expresión relativa de TRPA1 respecto a ACTBh en orofaringe humana es $2,736 \times 10^{-5} \pm 7,805 \times 10^{-6}$ en el dorso del cuerpo de la lengua, $1,493 \times 10^{-5} \pm 2,684 \times 10^{-6}$ en los pilares posteriores y $2,432 \times 10^{-5} \pm$

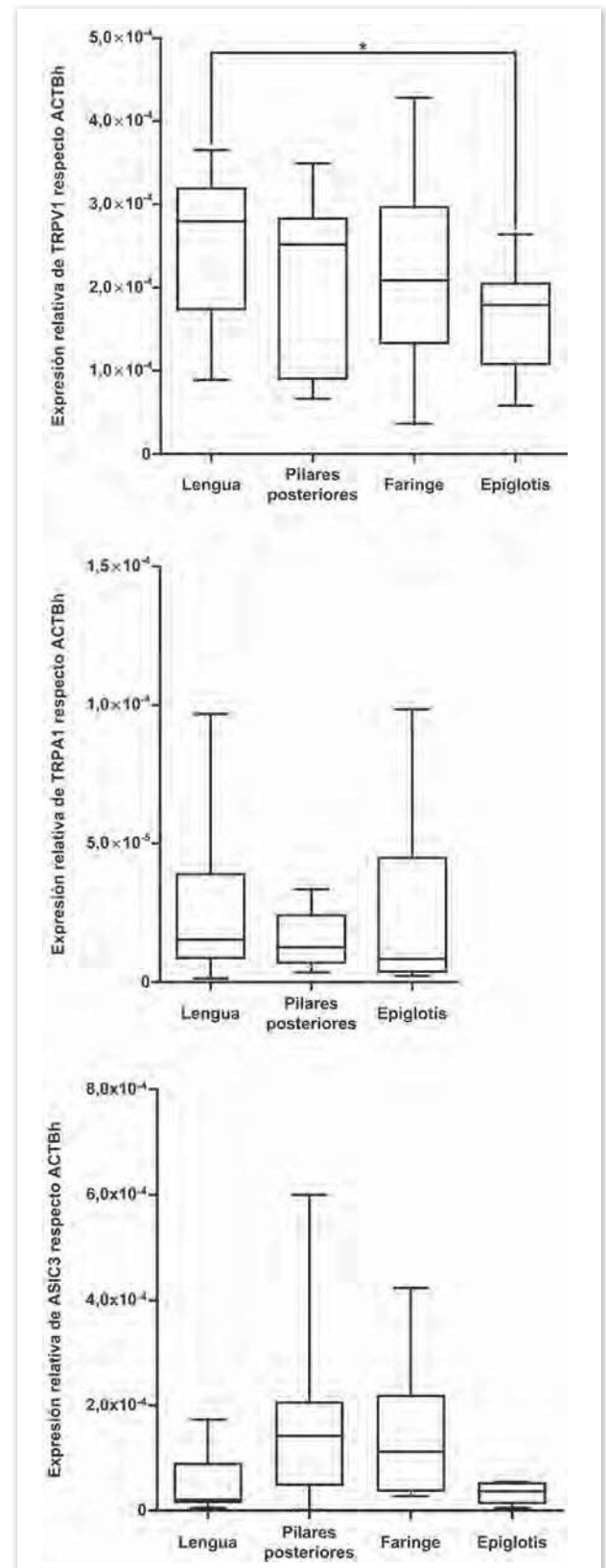


Figura 9. Análisis de la expresión de TRPV1, TRPA1 y ASIC3. A) Expresión relativa de TRPV1 (arriba), TRPA1 (centro) y ASIC3 (abajo) respecto al gen de referencia b-actina (ACTBh) en las áreas inervadas por los nervios trigémino (NC V), glossofaríngeo (NC IX) y vago (CN X). * $p < 0.05$. No se encontró expresión de TRPA1 en las muestras de faringe. Adaptada del artículo Alvarez-Berdugo et al (2016) (166).

$7,970 \times 10^{-6}$ en la cara lingual de la epiglotis. No se encontró expresión de TRPA1 en las muestras de faringe. Los niveles de expresión en el resto de regiones no presentan diferencias significativas entre ellos.

La expresión relativa de ASIC3 respecto a ACTBh en orofaringe humana es $4,842 \times 10^{-5} \pm 2,117 \times 10^{-5}$ en el dorso del cuerpo de la lengua, $1,732 \times 10^{-4} \pm 6,598 \times 10^{-5}$ en los pilares posteriores, $1,440 \times 10^{-4} \pm 4,303 \times 10^{-5}$ en la pared lateral y posterior de la faringe y $3,327 \times 10^{-5} \pm 1,071 \times 10^{-5}$ en la cara lingual de la epiglotis. Los niveles de expresión entre las regiones estudiadas no presentan diferencias significativas entre ellos.

TRPV1 se expresa en el dorso del cuerpo de la lengua con niveles significativamente superiores a los de TRPA1 ($p < 0,001$) y ASIC3 ($p < 0,05$). TRPA1 se expresa en los pilares posteriores con niveles significativamente inferiores a los de TRPV1 ($p < 0,001$) y ASIC3 ($p < 0,01$). No hay diferencias estadísticamente significativas en pared posterior de la faringe entre los niveles de expresión de TRPV1 y ASIC3. TRPV1 se expresa en la cara lingual de la epiglotis con niveles significativamente superiores a los de TRPA1 ($p < 0,001$) y ASIC3 ($p < 0,05$).

1.4. Resumen de los resultados

- 1) Aunque la mucosa orofaríngea está densamente inervada, la mayoría de las fibras nerviosas se encuentran por debajo de la membrana basal; sólo algunas fibras penetran entre las células epiteliales. Hemos identificado en la orofaringe humana terminales libres, estructuras corpusculares y botones gustativos que perciben todo el espectro de estímulos mecánicos, térmicos y químicos relacionados con la deglución.
- 2) El receptor TRPV1 se localiza tanto en las células epiteliales de la mucosa orofaríngea como en fibras sensoriales por debajo de la membrana basal. En cambio, TRPA1 se encuentra principalmente localizado por debajo de la membrana basal, ya sea en fibras nerviosas o en fibroblastos de la submucosa. TRPM8 se encuentra localizado en las fibras nerviosas que la inervan, ya sea en terminales libres de la mucosa o en estructuras corpusculares de la submucosa. ASIC3 se encuentra localizado en algunas fibras sensoriales que la inervan por debajo de la membrana basal.
- 3) Cuantitativamente, el receptor TRPV1 es el que más se expresa en todos los territorios estudiados de la orofaringe humana. ASIC3 y TRPA1 le siguen cuantitativamente y, finalmente, no hemos encontrado expresión de TRPM8 en las muestras de mucosa orofaríngea estudiadas.



CAPÍTULO 2

Farmacodinámica de los agonistas TRPV1

(Ver Anexo 4)

2.1. Curvas dosis-respuesta

Nuestros estudios muestran que la capsaicina (entre 10^{-7} y 10^{-5} M), la piperina (entre 10^{-6} y 10^{-3} M) y los capsaicinoides naturales (entre $1,2 \cdot 10^{-6}$ y $6 \cdot 10^{-5}$ M) consiguen estimular de forma concentración-dependiente el receptor TRPV1.

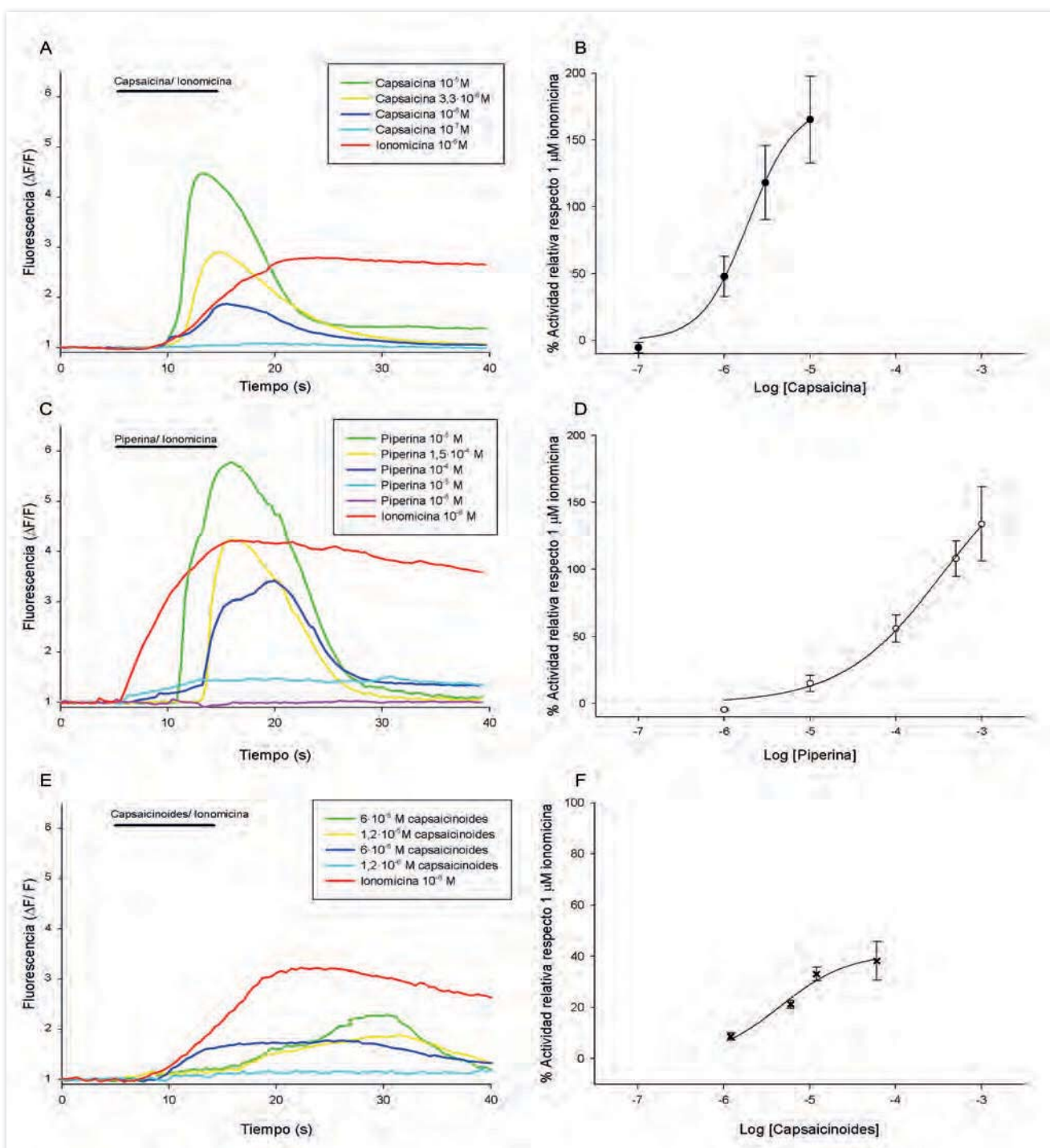


Figura 1. Liberación de calcio en el tiempo y curvas dosis-respuesta. Figura adaptada del artículo Alvarez-Berdugo et al (2014) (167). A), C) y E) Gráficas con la media de incremento de fluorescencia (ΔF) en función del tiempo respecto a la fluorescencia basal (F) previa a la exposición con agonistas a diferentes concentraciones. B), D) y F) Curvas dosis-respuesta de los distintos agonistas construida con el efecto máximo normalizado de cada concentración. Cada punto representa el promedio \pm EE de 3 experimentos independientes (n = 10).

Las curvas dosis-respuesta ajustadas a la ecuación de Hill dieron un efecto máximo (E_{max}) similar con capsaicina (**Figura 1.B**) y piperina (**Figura 1.D**) y significativamente superior con capsaicina que con capsaicinoides (**Figura 1.F**) ($176,6 \pm 35,83\%$ capsaicina, $204,8 \pm 184,3\%$ piperina y $40,99 \pm 6,14\%$ capsaicinoides; capsaicina vs capsaicinoides $P < 0.001$). El coeficiente de Hill de las curvas fue similar con los distintos agonistas ($1,59 \pm 0,86$ capsaicina, $0,70 \pm 0,50$ piperina y $1,18 \pm 0,45$ capsaicinoides). Tampoco hubo diferencias significativas entre el EC_{50} de los distintos agonistas ($1.90 \cdot 10^{-6}M$ capsaicina, $4.14 \cdot 10^{-4}M$ piperina y $4.36 \cdot 10^{-6}M$ capsaicinoides).

La pendiente en los experimentos con capsaicina (**Figura 1.A**) y piperina (**Figura 1.C**) fue significativamente más grande que en el experimento con capsaicinoides (**Figura 1.E**) ($830,1 \pm 128,1 \Delta F/F$ por segundo con capsaicina, $1238 \pm 146,8 \Delta F/F$ por segundo con piperina y $184,6 \pm 17,39 \Delta F/F$ por segundo con los capsaicinoides).

2.2. Desensitización y efecto de un agonista específico

La desensitización producida por una segunda exposición redujo el efecto máximo un $38,31 \pm 4,08\%$ con capsaicina, un $22,30 \pm 2,24\%$ con capsaicinoides y un $67,61 \pm 5,31\%$ con piperina.

La incubación con el antagonista de TRPV1 específico SB-366791 previa a una segunda exposición reduce el efecto máximo un $74,66 \pm 2,93\%$ con capsaicina, un $91,71 \pm 2,76\%$ con capsaicinoides y un $100 \pm 0,005\%$ con piperina.

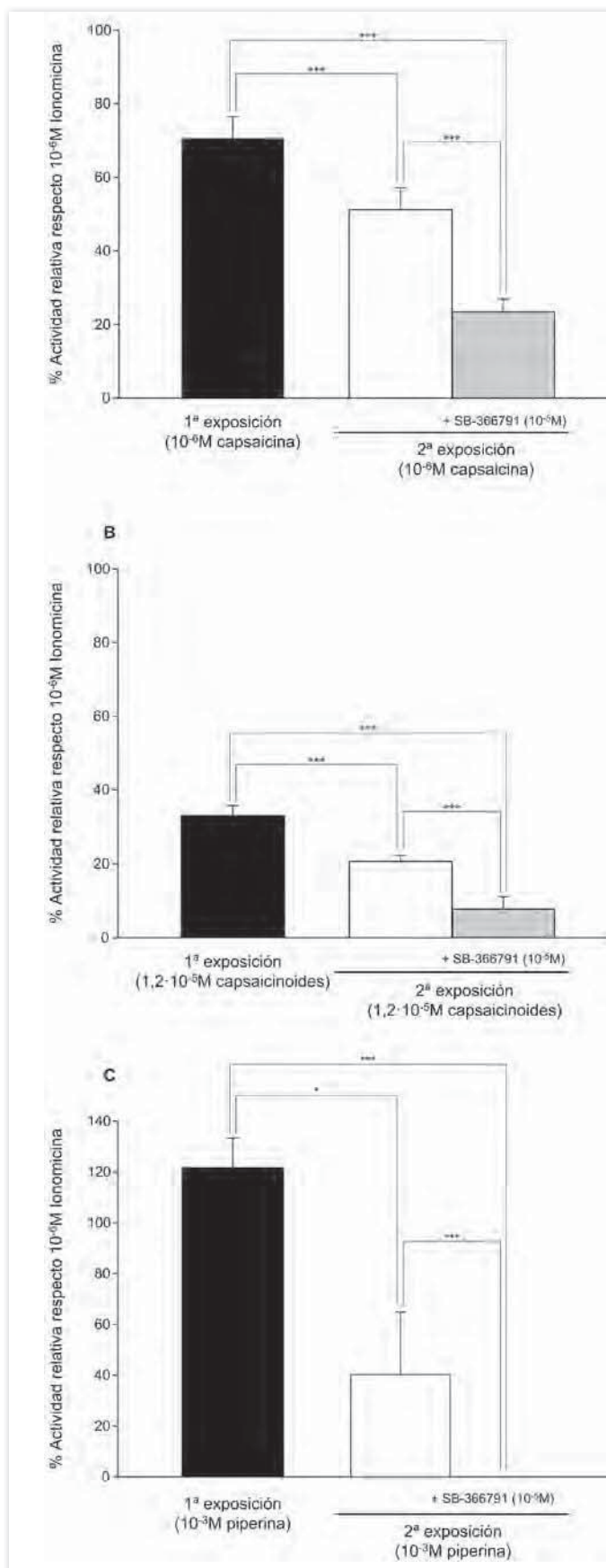


Figura 2. Efectos de desensitización y del antagonista SB-366791. Figura adaptada del artículo Alvarez-Berdugo et al (2014) (167).

Comparación del efecto máximo normalizado de la primera exposición a capsaicina (A), capsaicinoides (B) y piperina (C) (bloque negro) con una segunda exposición a la misma concentración del mismo agonista (bloque blanco) o con una segunda exposición previa incubación con el antagonista de TRPV1 específico SB-366791 (bloque a rayas). Los resultados están expresados como el promedio \pm EE.

2.3. Resumen de resultados

- 1) La capsaicina, la piperina y los capsaicinoides naturales consiguen estimular de forma concentración-dependiente el receptor TRPV1.
- 2) Tanto el coeficiente de Hill como el EC_{50} de los diferentes agonistas probados es similar, lo que implica un mecanismo de acción y una potencia similar para todos los agonistas sobre el receptor, pero los capsaicinoides naturales presentan un efecto máximo significativamente inferior al del resto de agonistas.
- 3) Una segunda exposición a estos agonistas tiene un efecto estimulante menor sobre TRPV1, lo que sugiere que se producen fenómenos de desensitización.
- 4) El uso de un antagonista específico de TRPV1 reduce significativamente el efecto de estos agonistas, lo que implica que su efecto se produce específicamente a través del receptor TRPV1.
- 5) El uso de un cultivo de células PC3, con expresión constitutiva TRPV1, en el estudio farmacodinámico de los agonistas de este receptor es una herramienta válida, alternativa al uso de cultivos de células manipuladas genéticamente para que expresen de forma heteróloga el receptor TRPV1.



CAPÍTULO 3

Estudio comparativo de la eficacia clínica de los tratamientos farmacológicos mediante agonistas TRPV1, TRPA1 y TRPM8

3.1. Demografía

En los distintos subestudios participaron un total de 142 pacientes con DO. Los pacientes estudiados eran ancianos ($75,99 \pm 0,93$ años) que tenían DO moderada o severa ($542,43 \pm 31,86$ según el SSQ) causada por el envejecimiento (45,8%), por un ictus (34,5%) o por enfermedades neurodegenerativas (19,7%) (Tabla 1).

	Estudio capsaicinoides	Estudio piperina	Estudio mentol	Pudín almidón	P valor
N	33	40	36	33	
Edad	$75,94 \pm 1,88$	$75,8 \pm 2$	$77,14 \pm 1,37$	$73,94 \pm 2,23$	0,614
Sexo (hombres)	20 (60,61%)	17 (42,50%)	16 (44,44%)	16 (48,48%)	0,432
SSQ	$315,15 \pm 47,97$	$529,6 \pm 44,9$	$843 \pm 61,84$	$432,9 \pm 73,6$	<0,001
Etiología					0,021
Envejecimiento	10 (30,3%)	23 (57,5%)	22 (61,1%)	10 (30,3%)	
Ictus	8 (24,2%)	4 (10%)	8 (22,2%)	8 (24,2%)	
Neurodeg	15 (45,5%)	13 (32,5%)	6 (16,7%)	15 (45,5%)	

Tabla 1. Datos demográficos y relativos a la DO de los pacientes del estudio. Neurodeg = Enfermedades neurodegenerativas.

Los resultados del SSQ muestran que los pacientes que participaron en el estudio del mentol tenían una severidad subjetiva de la disfagia significativamente superior a la del resto de estudios (mentol vs capsaicinoides $p < 0,001$; mentol vs piperina $p < 0,01$; mentol vs pudín almidón $p < 0,001$); los pacientes del estudio de los capsaicinoides presentaban una severidad subjetiva de la disfagia significativamente inferior a los del estudio de la piperina (capsaicinoides vs piperina $p < 0,05$).

En cuanto a la etiología de la disfagia, mientras que los pacientes de los estudios con capsaicinoides y con aumento de la viscosidad a pudín con espesantes de almidón presentaban proporciones similares entre etiologías, tanto los pacientes del estudio de piperina como del estudio de mentol tenían mayoritariamente disfagia debida al envejecimiento.

3.2. Fisiopatología

En conjunto, durante la deglución de bolos de viscosidad néctar, los pacientes presentaron alteraciones de la seguridad con una elevada prevalencia de penetraciones en el vestíbulo laríngeo (43,38%). Los pacientes también presentaban alteraciones de la eficacia de la deglución con una elevada prevalencia de residuos orales (20,10%) y faríngeos (18,50%) (Tabla 2).

Respecto a la respuesta motora orofaríngea, como promedio, los pacientes de todos los estudios presentaban un importante retraso en el tiempo de cierre del vestíbulo laríngeo ($393,13 \pm 15,38$ ms vs 160 ± 7 ms en voluntarios jóvenes (69)) y en el tiempo de apertura del esfínter esofágico superior ($345,67 \pm 14,31$ ms vs 220 ± 9 ms en voluntarios jóvenes (69)).

Por último, respecto a la cinética del bolo, como promedio, los pacientes de todos los estudios propulsaban débilmente el bolo con textura néctar alcanzando velocidades finales bajas ($0,444 \pm 0,016 \text{m/s}$ vs $0,620 \pm 0,160 \text{m/s}$ en voluntarios jóvenes (69)).

	CAPS 150 μM	PIPE 150 μM	PIPE 1mM	MENT 1mM	MENT 10mM	EST MS	P valor
Residuo oral	6,06%	13,73%	32,08%	31,37%	50,00%	8,16%	<0,001
Residuo faríngeo	17,68%	12,75%	16,04%	10,78%	31,25%	20,41%	<0,001
Penetraciones en el vestíbulo laríngeo	34,34%	52,94%	52,83%	47,06%	41,07%	41,84%	0,113
Tiempo de LVC (ms)	408,49 \pm 24,12	383,53 \pm 24,51	375,56 \pm 35,15	367,50 \pm 31,67	408,42 \pm 33,87	396,13 \pm 64,69	0,546
Tiempo de UESO (ms)	372,12 \pm 24,34	315,29 \pm 22,46	328,89 \pm 29,38	310,59 \pm 23,40	298,95 \pm 23,37	390,97 \pm 60,95	0,391
Velocidad final del bolo (m/s)	0,340 \pm 0,025	0,512 \pm 0,042	0,488 \pm 0,042	0,465 \pm 0,030	0,493 \pm 0,050	0,443 \pm 0,041	0,001

Tabla 2. Estado basal de la prevalencia de signos VFS, RMO y cinética del bolo en los pacientes del estudio. CAPS = Estudio capsaicinoides; PIPE = Estudio piperina; MENT = Estudio mentol; EST MS = Viscosidad pudín obtenida con almidón modificado; LVC = cierre del vestíbulo laríngeo; UESO = apertura del esfínter esofágico superior.

La prevalencia de residuos orales y faríngeos, los principales signos de alteración de la eficacia analizados en este estudio, era significativamente superior en los pacientes que participaron en el subestudio del mentol a 10mM que la del resto de estudios. En cambio, la prevalencia de penetraciones del bolo en el vestíbulo laríngeo, el principal signo de seguridad de la deglución analizado en este estudio, era similar en todos los estudios.

Además, los pacientes del estudio con capsaicinoides presentaban una velocidad final del bolo significativamente inferior a la de los pacientes de los subestudios con piperina y con 1mM de mentol (capsaicinoides vs piperina 150 μM $p < 0,01$; capsaicinoides vs piperina 1mM $p < 0,05$; capsaicinoides vs mentol $p < 0,05$).

3.3. Efecto del tratamiento

En cuanto a la seguridad de la deglución, la estimulación de TRPV1 con capsaicinoides naturales redujo significativamente la prevalencia de penetraciones laríngeas un -44,12% en T1 ($p = 0,005$) y un -50% en T2 ($p < 0,001$). La estimulación dual de TRPV1/A1 con piperina también redujo significativamente la prevalencia de penetraciones un -56,32% en T1 con 1mM ($p = 0,002$) y un -37,04% con 150 μM ($p = 0,004$). Por contra, sólo la estimulación de TRPM8 con concentración baja de mentol (1mM) redujo significativamente la prevalencia de penetraciones un -37,5% in T2 ($p < 0,001$) mientras que la concentración más elevada de mentol (10mM) no tuvo ningún efecto significativo sobre la seguridad de la deglución. Aumentar la viscosidad del bolo a pudín con almidón modificado redujo también significativamente la prevalencia de penetraciones un -77,11% ($p < 0,001$).

Al comparar el efecto de los distintos tratamientos sobre la seguridad de la deglución, tanto el aumento de viscosidad con espesantes de almidón modificado (intervalo de confianza del *odds ratio* [0,001-0,208]) como el tratamiento con capsaicinoides (intervalo de confianza del *odds ratio* [0,073-0,686]) tienen un efecto significativamente superior al tratamiento con mentol 10mM (intervalo de confianza del *odds ratio* [0,406-4,662]). El efecto de la piperina sobre la seguridad de la deglución no presenta diferencias significativas respecto al resto de tratamientos.

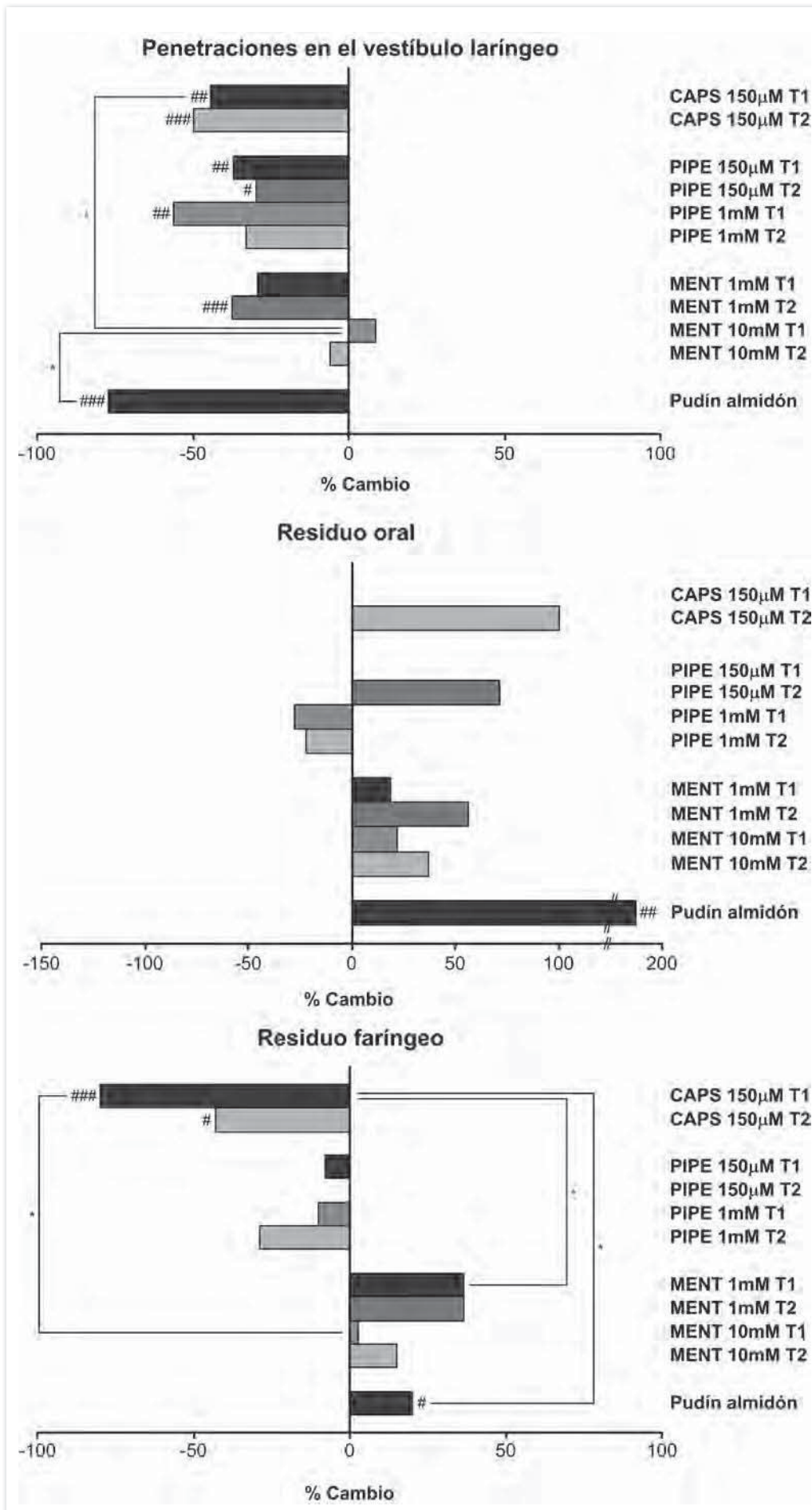


Figura 1. Comparación del efecto de los tratamientos sobre la prevalencia de signos videofluoroscópicos de la deglución. CAPS = Estudio capsaicinoides; PIPE = Estudio piperina; MENT = Estudio mentol. Con # se indica la significación estadística del test de McNemar entre el tratamiento y el control. Con * se indica que hay diferencia significativa entre el efecto de dos tratamientos.

En cuanto a la eficacia de la deglución, el tratamiento con capsaicinoides redujo la prevalencia de residuos faríngeos un -80% en T1 ($p < 0,0001$) y un -42,86% en T2 ($p = 0,019$) mientras que no tuvo ningún efecto significativo sobre el residuo oral. Los tratamientos de piperina o mentol no tuvieron ningún efecto significativo en la prevalencia de residuo faríngeo ni oral. En cambio, aumentar la viscosidad del bolo a pudín con almidón modificado aumentó significativamente el residuo oral un 173,63% ($p = 0,0019$) así como también el residuo faríngeo un 19,89% ($p = 0,0376$).

Al comparar el efecto de los distintos tratamientos sobre la eficacia de la deglución, el tratamiento con capsaicinoides (intervalo de confianza del *odds ratio* [0,001-0,234]) tuvo un efecto significativamente superior al de mentol, tanto 1mM (intervalo de confianza del *odds ratio* [0,226-9,102]) como 10mM (intervalo de confianza del *odds ratio* [0,352-2,843]), y al aumento de viscosidad a pudín con almidón modificado (intervalo de confianza del *odds ratio* [1,055-6,562]). El efecto de la piperina sobre la eficacia de la deglución no presentó diferencias significativas respecto al resto de tratamientos.

En cuanto a los tiempos de la RMO, el tratamiento con capsaicinoides redujo significativamente tanto el tiempo de LVC (-24,38% $p = 0,001$ en T1 y -6,28% $p = 0,040$ en T2) como el de UESO (-12,73% $p = 0,014$ en T1). El tratamiento con piperina redujo significativamente el tiempo de LVC en las dos concentraciones estudiadas (-25,5% $p = 0,001$ en T1 y -11,27% $p = 0,014$ en T2 de 150 μ M; -14,56% $p = 0,018$ en T1 y -15,82% $p = 0,009$ en T2 de 1mM) pero no tuvo ningún efecto significativo sobre el tiempo de UESO. En el caso del tratamiento con mentol, sólo su concentración más elevada (10mM) redujo significativamente el tiempo de LVC (-18,44% $p = 0,039$ en T1 y -12,97% $p = 0,012$ en T2) y tampoco tuvo ningún efecto significativo sobre el tiempo de UESO. Por último, aumentar la viscosidad a pudín tuvo un efecto opuesto aunque no significativo sobre tiempo de LVC (41,73% $p = 0,150$) y retrasó de forma significativa el tiempo de UESO (51,16% $p = 0,047$).

Al comparar el efecto de los distintos tratamientos sobre la RMO, el T1 con capsaicinoides tuvo un efecto sobre el tiempo de LVC superior al T1 con mentol 1mM ($p = 0,055$). Por otro lado, aumentar la viscosidad a pudín retrasó significativamente el tiempo de LVC respecto al efecto obtenido por T1 y T2 con capsaicinoides ($p < 0,001$ y $p = 0,042$ respectivamente), T1 con piperina 150 μ M ($p = 0,004$), T2 con piperina 1mM ($p = 0,040$) y T1 con mentol 10mM ($p = 0,036$). Aumentar la viscosidad a pudín también retrasa significativamente el tiempo de UESO respecto al efecto obtenido por T1 y T2 con capsaicinoides ($p = 0,003$ y $p = 0,024$ respectivamente), T1 y T2 con piperina 150 μ M ($p = 0,015$ y $p = 0,040$ respectivamente), T2 con piperina 1mM ($p = 0,042$) y T2 con mentol 1mM y 10 mM ($p = 0,029$ y $p = 0,050$ respectivamente).

En cuanto a la cinética del bolo, el tratamiento con capsaicinoides aumentó la velocidad final bolo un 36,51% ($p = 0,008$) en T1 y el tratamiento con piperina 150 μ M la aumentó un 23,63% ($p = 0,030$) en T1. El resto de tratamientos con estimulantes no consiguió un aumento significativo de la velocidad final del bolo. Por el contrario, aumentar la viscosidad a pudín redujo significativamente la velocidad final del bolo un -13,44% ($p = 0,034$).

Al comparar el efecto de los distintos tratamientos sobre la cinética del bolo, aumentar la viscosidad a pudín ralentizó significativamente la velocidad final del bolo respecto al efecto logrado por T1 y T2 con capsaicinoides ($p < 0,001$ y $p = 0,006$ respectivamente), T1 y T2 con piperina 150 μ M ($p = 0,005$ y $p = 0,006$ respectivamente), T1 y T2 con piperina 1mM ($p = 0,019$ y $p = 0,006$ respectivamente) y T1 y T2 con mentol 1mM ($p = 0,045$ y $p = 0,010$ respectivamente).

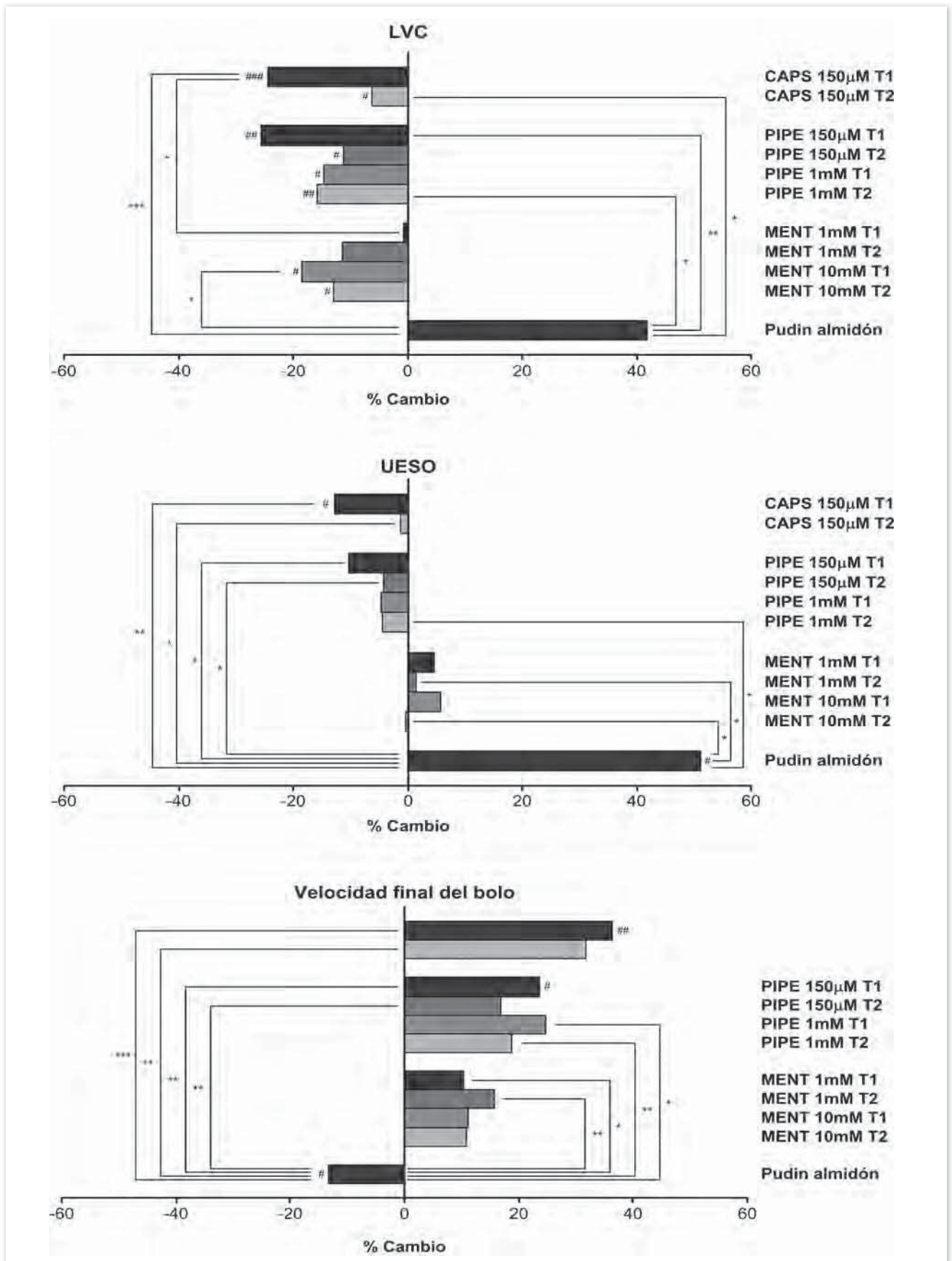


Figura 2. Comparación del efecto de los tratamientos sobre la respuesta motora orofaríngea y la cinética de la deglución. CAPS = Estudio capsaicinoides; PIPE = Estudio piperina; MENT = Estudio mentol. Con # se indica la significación estadística del test de Wilcoxon entre el tratamiento y el control. Con * se indica la significación estadística de la U de Mann-Whitney entre el efecto de dos tratamientos.

3.4. Resumen de resultados

- 1) En este conjunto de estudios se incluyeron pacientes ancianos, algunos de los cuales habían padecido un ictus o presentaban enfermedades neurodegenerativas como principales factores de riesgo para presentar alteraciones en la deglución.
- 2) Todos los pacientes que participaron en el estudio presentaban disfagia orofaríngea con signos clínicos y videofluoroscópicos de alteración de la seguridad de la deglución debido a tener una RMO retrasada y prolongada. Una gran mayoría de estos pacientes también presentaban alteración de la eficacia de la deglución debido a una disminución de fuerza de propulsión lingual del bolo.
- 3) La estimulación de los receptores TRPV1 con capsaicinoides naturales o TRPV1/A1 con piperina redujo la prevalencia de síntomas videofluoroscópicos de alteración de la seguridad a un nivel similar al conseguido al aumentar la viscosidad del bolo a pudín con espesantes de almidón. La estimulación de TRPM8 con mentol también redujo –aunque con menor intensidad– la prevalencia de alteraciones de la seguridad, pero sólo a concentraciones más bajas.
- 4) A diferencia del efecto producido por el aumento de la viscosidad del bolo a pudín –que incrementa el residuo orofaríngeo–, la estimulación de los receptores TRPV1 mediante capsaicinoides mejoró la eficacia de la deglución y redujo la prevalencia de pacientes con residuo orofaríngeo. Suplementar el bolo con piperina o con mentol no produjo ningún efecto significativo sobre los parámetros de eficacia de la deglución.
- 5) Mientras que el incremento de la viscosidad del bolo a viscosidad pudín reduce la prevalencia de penetraciones del vestíbulo laríngeo gracias a ralentizar el proceso de deglución y la velocidad del bolo, la estimulación de los receptores TRPV1, TRPA1 y TRPM8 con sus respectivos agonistas logra su efecto terapéutico sobre la seguridad de la deglución gracias a acelerar la RMO y hacer que el VL se cierre antes para proteger más precozmente la vía respiratoria.



DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

A pesar de su elevada prevalencia y de sus graves efectos tanto en la salud como en la calidad de vida del paciente y en el coste sanitario que puede conllevar, así como su elevada tasa de mortalidad, la DO no tiene todavía un tratamiento farmacológico específico.

En esta Tesis hemos desarrollado las bases para una nueva línea de tratamiento farmacológico específico para la DO mediante investigación traslacional, partiendo de la investigación básica (histología y biología molecular) hasta llegar al ensayo de distintos tratamientos en estudios clínicos, pasando por el estudio farmacodinámico de estos tratamientos. Estos nuevos tratamientos están basados en la estimulación sensorial con agonistas farmacológicos de los receptores que se encuentran en la orofaringe humana y que puedan añadirse al bolo alimentario y buscan mejorar la deglución promoviendo una RMO más rápida y una mayor fuerza de propulsión lingual.

El estudio de la histología y la inervación de la mucosa orofaríngea nos permite sentar las bases de cómo se percibe normalmente el bolo durante la deglución, mientras que el estudio de la expresión y localización de los receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8 y ASIC3 nos indica las potenciales dianas farmacológicas para estimular la deglución y así reducir los signos clínicos de la DO.

El estudio de la farmacodinámica de los agonistas del receptor TRPV1 nos permite diseñar de forma racional la estrategia terapéutica basada en el uso de estos agonistas. Así podemos establecer el rango de concentraciones que manifiestan efecto terapéutico y el efecto de la desensitización como posible factor limitante de esta estrategia terapéutica.

Los estudios clínicos para evaluar el efecto de la estimulación de TRPV1, TRPA1 y TRPM8 con sus respectivos agonistas nos permite establecer cuál es el tratamiento que presenta una mayor eficacia terapéutica. Además, al compararlos con el tratamiento clásico compensatorio podemos determinar las diferencias entre sus mecanismos de acción sobre la respuesta motora orofaríngea.

La integración de todos estos resultados nos permiten proponer una nueva estrategia terapéutica para tratar a los pacientes con DO neurogénica y sentar las bases para futuras líneas de investigación que busquen nuevas potenciales dianas con las que tratar la DO y que desarrollen técnicas sencillas que nos permitan determinar qué pacientes con DO se pueden beneficiar de estos nuevos tratamientos.

1. Histología y biología molecular de la percepción sensorial orofaríngea

En el primer capítulo de esta Tesis Doctoral hemos estudiado los elementos histológicos relacionados con la percepción sensorial de la mucosa orofaríngea humana y hemos observado que:

- a) La estructura de la mucosa orofaríngea humana a nivel histológico es diferente en la lengua (mucosa especializada) respecto a la faringe y la epiglotis (mucosa de recubrimiento).
- b) La inervación sensorial de la mucosa orofaríngea es generalmente subepitelial, aunque también hay terminaciones nerviosas que penetran el epitelio. También hemos observado estructuras sensoriales especializadas como un botón gustativo, estructuras corpusculares y células de Merkel.
- c) TRPV1 y TRPA1 se expresan en las regiones inervadas por los NC V, IX y X, pero mientras TRPV1 se localiza principalmente en la membrana de las células epiteliales, TRPA1 se localiza principalmente por debajo del epitelio. TRPM8 se expresa en la orofaringe humana, pero se localiza en las termina-

ciones nerviosas que inervan la mucosa. ASIC3 se expresa en las regiones inervadas por los NC V, IX y X y se localiza en las terminaciones nerviosas que inervan la mucosa.

1.1. Estructura e inervación de la mucosa orofaríngea

Los resultados obtenidos muestran que la mucosa especializada que recubre el dorso de la lengua humana es distinta y está especializada con respecto a la mucosa de recubrimiento de la faringe y la cara lingual de la epiglotis humana. Mientras que la mucosa especializada de la lengua presenta papilas filiformes recubiertas por un epitelio paraqueratinizado, la mucosa de recubrimiento de la faringe y la epiglotis presenta papilas más similares a las de la dermis y está cubierta por un epitelio no queratinizado. Estas características concuerdan con las descritas previamente (13,14) y nos sirven como base morfológica para poder estudiar la inervación y la localización de los receptores en la mucosa.

Nuestros resultados muestran como los nervios que inervan la orofaringe viajan en haces gruesos en las regiones más profundas de la mucosa, por debajo de la membrana basal, mientras que las fibras simples que forman las terminaciones nerviosas llegan hasta la membrana basal e incluso algunas la atraviesan de forma esporádica, penetrando así en el epitelio más superficial. Sin embargo, mientras que la inervación subepitelial puede ser muy densa y numerosa, la inervación intraepitelial es poco habitual en nuestras muestras. Algunos estudios previos han mostrado la presencia de terminales nerviosos justo por debajo de la lámina basal, llegando incluso a contactar con ella (32) mientras que otros estudios también han encontrado terminaciones nerviosas dentro del epitelio, llegando a capas superficiales (35). Estas terminaciones libres son las que perciben los estímulos térmicos y químicos a través de receptores especializados (168) y es importante determinar dónde se encuentran estas terminaciones ya que esto puede determinar si estos estímulos pueden activar con más facilidad y eficacia las vías aferentes que inician la deglución. Habitualmente se asume que estas terminales sensoriales alcanzan las capas epiteliales más superficiales de la orofaringe y laringe humanas y nuestro estudio demuestra claramente que esto es infrecuente y son mucho más frecuentes por debajo de la membrana basal.

En nuestras muestras también hemos encontrado estructuras sensoriales especializadas como corpúsculos y botones gustativos. Estudios previos ya habían localizado estas y otras estructuras especializadas en la mucosa oral y faríngea humana y de otros animales (24,26-28,33). Estas estructuras permiten que la mucosa orofaríngea perciba estímulos térmicos, mecánicos y químicos, no sólo para percibir las características organolépticas de los alimentos, sino también para activar la deglución (74,104,105). Nuestro estudio confirma estas observaciones.

El estudio de la inervación de la mucosa orofaríngea a nivel histológico también nos permite entender mejor los procesos fisiopatológicos que llevan a la pérdida de sensibilidad orofaríngea en pacientes con disfagia. En pacientes con Parkinson, Alzheimer o demencia de cuerpos de Lewis, se han encontrado acumulaciones de α -sinucleína en los nervios que inervan la orofaringe (168); estas alteraciones se han relacionado con el daño en los nervios sensoriales y motores periféricos que causan la disfunción deglutoria en estos pacientes (169,170), siendo ésta una de las causas principales de la pérdida de sensibilidad en la orofaringe y del aumento en el riesgo de aspiraciones en pacientes de Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas que afectan al sistema nervioso central (72,169,171,172).

1.2. Expresión y localización de los receptores sensoriales

Los resultados obtenidos durante esta tesis muestran que TRPV1, TRPA1 y ASIC3 se expresan en las regiones inervadas por los NC V, IX y X, mientras que no hemos encontrado expresión de TRPM8 a nivel

de mRNA en esta región. La localización de estos receptores presenta diferentes patrones: mientras que TRPV1 se encuentra principalmente en la membrana de las células epiteliales que recubren la mucosa de estas regiones, TRPA1 se encuentra principalmente por debajo de la membrana basal, tanto en células (posiblemente fibroblastos) como en fibras nerviosas, y TRPM8 y ASIC3 se encuentran principalmente en las fibras nerviosas que inervan estas regiones (**Figura 1A**). Aunque no hemos utilizado un método cuantitativo para el estudio de la concentración de receptores sino que la figura resume nuestra interpretación subjetiva de los resultados obtenidos, también hemos observado diferencias claras en la cantidad de proteína encontrada de cada uno de los receptores estudiados, siendo TRPV1 y TRPA1 los más abundantes por encima y por debajo de la membrana basal respectivamente, TRPV1 muy abundante por encima y TRPM8 y ASIC3 mucho menos abundantes y principalmente localizados por debajo de la membrana basal (**Figura 1B**).

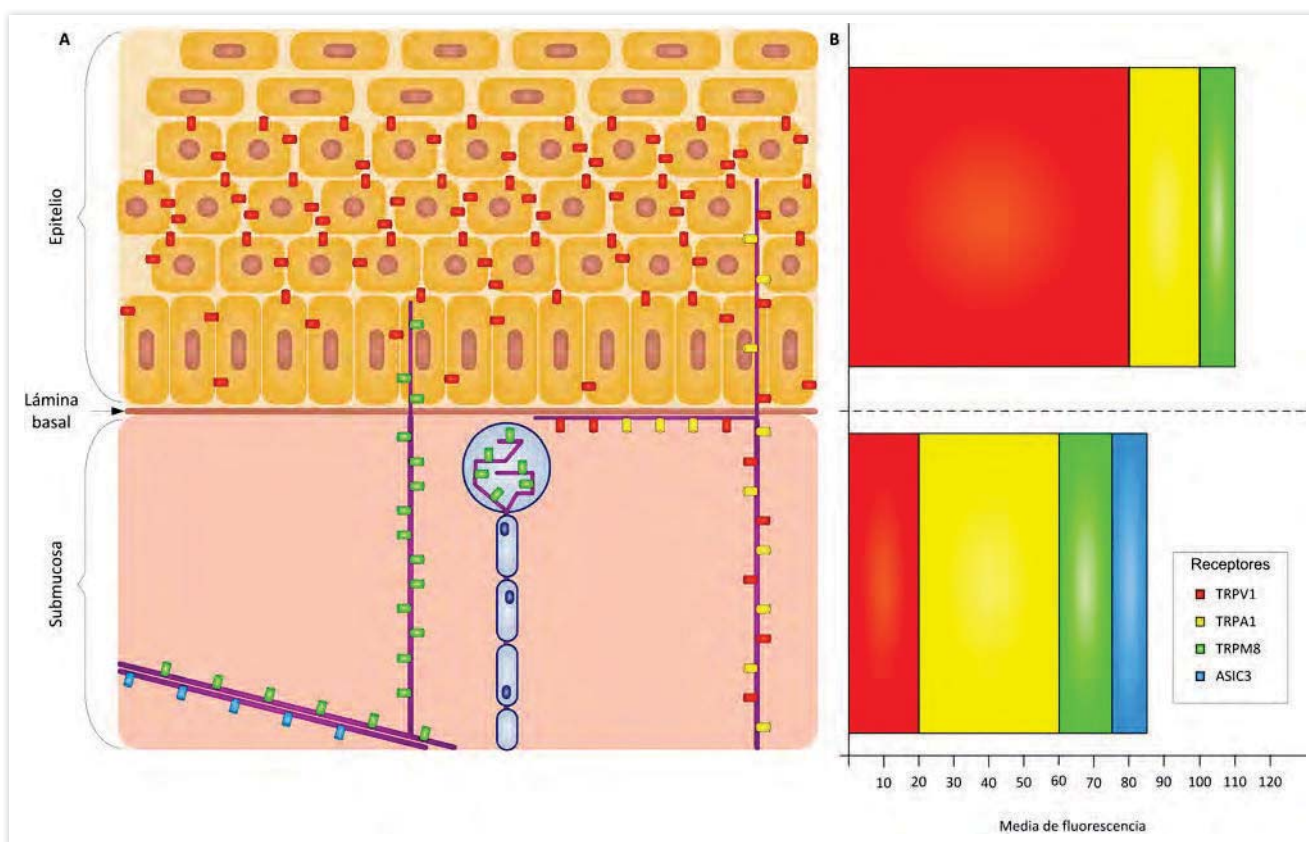


Figura 1. Distribución de los receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8 y ASIC3 en la mucosa orofaríngea humana. A) Dibujo esquemático de la distribución de los receptores en la mucosa. B) Interpretación subjetiva de la cantidad de receptores a ambos lados de la membrana basal.

Los NC V, IX y X permiten la percepción de estímulos térmicos y químicos en la orofaringe gracias a sus terminales libres. La señal producida por estos estímulos periféricos viaja a través de los axones de estos nervios hasta el soma localizado en el ganglio correspondiente y después prosiguen hasta el núcleo espinal del complejo del trigémino. Allí se produce la primera sinapsis con neuronas de segundo orden que pueden seguir una de las siguientes vías: llevar la señal hasta el CPG en el bulbo raquídeo del tronco encefálico o llegar hasta la zona media del núcleo ventral posterior del tálamo donde se producirá otra sinapsis para que una neurona de tercer orden lleve la señal hasta el córtex sensorial (173). Muy recientemente hemos revisado los circuitos neurales que controlan los mecanismos de la deglución en dos revisiones que se han publicado muy recientemente (74,174).

Nuestros resultados de inmunofluorescencia muestran la presencia de TRPV1 en la membrana celular de las células epiteliales de la lengua, la faringe y la epiglotis, así como también en fibras nerviosas de pequeño diámetro. También hemos encontrado expresión en todas estas regiones y hemos observado como esta expresión se reduce a medida que avanzamos craneocaudalmente por el tracto aerodigestivo, con niveles de expresión significativamente superiores en lengua que en epiglotis.

La expresión de TRPV1 ha sido ampliamente estudiada en modelos murinos desde que este receptor fue identificado (123), mostrando que puede encontrarse en la orofaringe tanto en fibras nerviosas aferentes como en células epiteliales (150,175,176). Sin embargo, hay mucha menos información sobre la expresión de TRPV1 en la orofaringe humana. Hou et al encontraron expresión y localización de TRPV1 en células neuronales de ganglios trigeminales humanos, así como también colocalización de TRPV1 con los neuropéptidos proinflamatorios CGRP y SP (177). También se ha localizado TRPV1 en terminaciones nerviosas en laringe y lengua humanas (178,179). Otros estudios han encontrado la expresión de TRPV1 en células epiteliales de la lengua (178,180) donde, como se había hipotetizado previamente para la piel, la activación de estos receptores podría promover la liberación de mediadores inflamatorios que, al entrar en contacto con los terminales nerviosos, amplificarían la señal de los estímulos (181).

Nuestros resultados muestran la presencia de TRPA1 siempre por debajo de la lámina basal del epitelio, en fibroblastos y en fibras nerviosas sensoriales, en todas las regiones estudiadas. También hemos encontrado expresión de TRPA1 en regiones inervadas por los NC V, IX y X, sin diferencias significativas entre regiones, pero con niveles significativamente inferiores a los de TRPV1 en estas regiones.

En estudios previos se ha descrito que el 20% de las neuronas con axones de pequeño diámetro del ganglio trigeminal expresan TRPA1 y, además, todas ellas coexpresan TRPV1 y la mayoría también presentan CGRP (135); a nivel periférico, se ha encontrado TRPA1 en nervios de lengua y faringe humanas (182,183). Fuera de la orofaringe se ha encontrado TRPA1 en células epiteliales y fibroblastos de la piel y de la mucosa bronquial (138,139), donde podría estar involucrado en procesos inflamatorios estimulando la síntesis y la liberación de citoquinas como la interleuquina 8 (138,139,184).

Nuestros resultados muestran la presencia de TRPM8 por debajo de la lámina basal del epitelio, en los haces de fibras nerviosas que recorren la submucosa así como también en bulbos de Krause y en las fibras nerviosas que pasan próximas a la lámina basal y, en ocasiones, la atraviesan y penetran en el epitelio. Las muestras de mucosa orofaríngea estudiadas no presentaban expresión de TRPM8.

La expresión y localización de TRPM8 en orofaringe y ganglio trigeminal se ha estudiado exclusivamente en modelos murinos (143,185-187). Estos estudios han mostrado como TRPM8 se expresa en neuronas del ganglio trigeminal y en ganglios de la raíz dorsal (143,186), más concretamente en fibras tipo C que no expresan TRPV1 ni CGRP (143,185). A nivel periférico, estos estudios muestran cómo TRPM8 se encuentra en fibras que viajan justo por debajo de la lámina basal, penetrando en ocasiones en el epitelio (185,187), así como también en fibras que rodean, pero no penetran, los botones gustativos de la lengua (185).

Nuestros resultados muestran la presencia de ASIC3 por debajo de la lámina basal del epitelio, en

algunas de las fibras nerviosas que recorren la submucosa en haces, así como también en algunas de las fibras nerviosas que se encuentran justo por debajo de la lámina basal. También hemos encontrado expresión de ASIC3 en todas las regiones estudiadas, sin diferencias significativas de expresión entre regiones.

La expresión y localización de ASIC3 se ha estudiado previamente tanto en humanos como en animales (188), pero no en la orofaringe. Estos estudios sí han determinado que ASIC3 se expresa en neuronas sensoriales del ganglio trigeminal, del ganglio nodoso y de los ganglios de las raíces dorsales en humanos. Se ha encontrado expresión de ASIC3 en neuronas de diámetro pequeño y grande, lo que sugiere una participación de este receptor tanto en funciones de nocicepción como de mecanorrecepción (189). Nuestros resultados en la orofaringe son por tanto completamente novedosos.

Las diferencias encontradas entre expresión y localización de los receptores pueden explicarse, en general, por el hecho que aunque no pudiéramos encontrar mRNA en las muestras estudiadas, éste se localizaría en el soma de las neuronas en sus respectivos ganglios y la proteína sería activamente transportada hasta los terminales nerviosos. Esto también explica los niveles de expresión más elevados de TRPV1 respecto al resto de receptores estudiados, ya que mientras la mayoría de receptores sólo están expresados en los nervios que inervan el tejido, TRPV1 se encuentra también expresado en las células epiteliales que recubren toda la mucosa.

Estos resultados nos permiten afirmar que TRPV1, TRPA1, TRPM8 y ASIC3 pueden ser utilizados como dianas terapéuticas para tratar la DO, ya que estos receptores se encuentran en las principales regiones implicadas en la percepción de las características fisicoquímicas del bolo alimentario durante la deglución.

2. Farmacodinámica de los agonistas de TRPV1 y TRPA1

En el segundo capítulo de esta tesis se ha estudiado la farmacodinámica de tres agonistas naturales de TRPV1 y TRPA1 y se ha observado que:

- a) La capsaicina y la piperina en un mayor grado y los capsaicinoides naturales en un grado menor estimulan los canales de TRPV1.
- b) Una segunda exposición a estos agonistas disminuye su efecto sobre TRPV1, lo que sugiere procesos de desensitización.
- c) La exposición a un antagonista específico de TRPV1 reduce de forma significativa el efecto de estos agonistas, lo que nos indica que su mecanismo de acción está mediado de forma específica por este receptor.
- d) Las células PC3 son una herramienta útil para el estudio de la farmacodinámica de agonistas de TRPV1.

Nuestros resultados muestran como la capsaicina y la piperina tienen un E_{max} y un coeficiente de Hill similares, además, no hemos encontrado diferencias significativas en sus EC_{50} . En cambio, ensayos previos sí encontraron un menor efecto máximo para la piperina respecto a capsaicina y diferencias significativas en su EC_{50} (190,191). También hemos observado que la salsa de capsaicinoides naturales presenta una E_{max} significativamente inferior a la de capsaicina y piperina. La explicación para esta diferencia podría deberse al hecho que, como se comprobó cromatográficamente con el método AOAC 995.03 (111), la solución utilizada contiene diferentes capsaicinoides naturales además de la capsaicina, que es el vaniloide con el mayor efecto pungente (192).

Nuestros resultados también muestran que todos los agonistas estudiados presentan fenómenos de desensitización tras exposición repetida. En estudios previos ya se había mostrado la desensitización de TRPV1 por la exposición repetida de capsaicina (123,190,193) y piperina (190), aunque en nuestro estudio la piperina logró niveles de desensitización de TRPV1 superiores.

Finalmente, el uso de SB-366791, un antagonista específico de TRPV1, nos permitió verificar que los agonistas utilizados producen su efecto de forma específica a través de TRPV1. En estudios previos se había utilizado capsazepina como antagonista específico para receptores de vaniloides, pero este antagonista también actúa de forma inespecífica en otros receptores. En cambio, SB-366791 es un antagonista con gran potencia y un perfil de selectividad mejorado respecto a otros antagonistas de TRPV1 (194). Otra diferencia entre nuestro estudio y otros estudios previos es el uso de células PC3, un modelo biológico que se ha utilizado poco en comparación con células HEK293 transfectadas para que expresen TRPV1. Nuestro estudio muestra que las células PC3 son un buen sustituto para estudiar la farmacología de TRPV1 y, además, son más accesibles ya que al expresar de forma constitutiva el receptor, no requieren equipamiento para realizar transfección de las células.

Como ya se ha indicado previamente, TRPV1 es una prometedora diana terapéutica para tratar la DO, especialmente en pacientes con sensibilidad orofaríngea alterada. En estudios clínicos previos ya se había mostrado que la capsaicina y la piperina son efectivas mejorando la respuesta deglutoria (112,114). Para poder realizar nuestros propios estudios clínicos (111,115) necesitábamos conocer la farmacodinámica de estos agonistas, y más concretamente la dosis óptima, ya que es un hecho bien conocido que a concentraciones elevadas estas sustancias bloquean el receptor, motivo por el cual se han utilizado terapéuticamente como agentes anestésicos locales. Por eso realizamos nuestro propio bioensayo con células PC3 que expresan constitutivamente TRPV1.

Nuestros resultados nos permitieron determinar que las concentraciones óptimas para realizar un ensayo clínico para estudiar el efecto de estos agonistas en pacientes con DO son: 10 μM para la capsaicina, entre 150 μM y 1mM para piperina, y 150 μM para la salsa de capsaicinoides naturales (111,115). Estos resultados han sido la base del desarrollo de nuestros estudios clínicos.

3. Comparación del efecto clínico de los tratamientos

En el tercer capítulo de esta tesis se ha estudiado el efecto clínico de tres tratamientos farmacológicos en pacientes con DO haciendo un compendio de los diferentes estudios realizados individualmente en nuestro laboratorio y se ha comparado este efecto entre ellos y respecto al tratamiento compensatorio clásico basado en aumentar la viscosidad de los fluidos. Se ha observado que:

- a) La estimulación TRPV1 con capsaicinoides tiene mayor efecto terapéutico sobre los signos clínicos de la disfagia y la RMO que la estimulación dual TRPV1/A1 con piperina o la estimulación de TRPM8 con mentol.
- b) Mientras que la estimulación de receptores TRP aumenta la velocidad del bolo y acelera la RMO, aumentar la viscosidad con espesantes reduce la velocidad del bolo y retrasa aún más la RMO.

Los pacientes que participaron en este estudio eran principalmente ancianos con DO moderada o severa causada por el envejecimiento, por un ictus o por una enfermedad neurodegenerativa. Estos pacientes presentaban una RMO lenta y retrasada y una débil propulsión del bolo, lo que provoca una elevada prevalencia de penetraciones laríngeas y de residuos orofaríngeos, signos relacionados con un elevado riesgo de complicaciones respiratorias y nutricionales (46).

En estudios previos de nuestro grupo ya habíamos observado que los ancianos y los pacientes con enfermedades neurológicas que presentan disfagia tienen una sensibilidad orofaríngea reducida (73). Una menor percepción sensorial contribuye a una respuesta motora alterada (74,195). Es por eso que la estrategia terapéutica probada en este estudio se basa en aumentar el estímulo sensorial utilizando agonistas naturales de los receptores TRP que, como se ha mostrado previamente, se encuentran en la orofaringe humana.

Nuestros resultados muestran como la respuesta motora deglutoria mejora significativamente al estimular los receptores TRP en estos pacientes con DO. Así, estos tratamientos logran reducir las alteraciones en la seguridad de la deglución con un efecto terapéutico similar al logrado por el aumento de la viscosidad de los fluidos con espesantes. Sin embargo, el mecanismo terapéutico de los agonistas de receptores TRP es opuesto al mecanismo compensatorio producido por el aumento de la viscosidad, ya que una mayor viscosidad logra mejorar la seguridad de la deglución reduciendo la velocidad del bolo y retrasando aún más la RMO (69).

Con respecto a la eficacia de la deglución, sólo la suplementación del bolo con capsaicinoides reduce significativamente la prevalencia de residuos faríngeos, mientras que el resto de agonistas de receptores TRP tienen un efecto neutro sobre la eficacia de la deglución. En cambio, aumentar la viscosidad del bolo con espesantes basados en almidón, aumenta significativamente tanto los residuos orales como los residuos faríngeos.

En los últimos años se está desarrollando y comercializando una nueva generación de espesantes basados en gomas en lugar de almidón que han logrado mantener su efecto compensatorio respecto a la seguridad de la deglución mientras evitan el efecto no deseado sobre la eficacia producido por los espesantes de almidón (196,197). Sin embargo, estos espesantes basados en goma xantana logran su efecto con el mismo mecanismo compensatorio que los espesantes de almidón, es decir, retrasando el tránsito del bolo a través de la faringe para evitar las penetraciones laríngeas aún y el cierre retardado del VL (197).

Entre los distintos tratamientos farmacológicos comparados, los capsaicinoides son los que presentan un mayor efecto terapéutico tanto a nivel de RMO como a nivel de signos clínicos, ya que no sólo reduce la prevalencia de penetraciones en el vestíbulo laríngeo sino que también reduce la prevalencia de residuos faríngeos. Esto contrasta con lo observado en los estudios de farmacodinámica in vitro presentados previamente, donde la piperina tenía un efecto máximo mayor que la mezcla de capsaicinoides; una posible explicación para esta discrepancia es que, in vivo, el pH ligeramente ácido de la salsa de capsaicinoides podría contribuir a la sensibilización de los canales de TRPV1 así como también actuar sobre los canales de ASIC3 descritos previamente, aumentando así su efecto estimulante y por tanto su efecto terapéutico.

Una posible limitación de esta comparación de estudios clínicos es que los resultados podrían verse afectados por algunas de las diferencias entre las poblaciones y fenotipos que componen cada uno de los subgrupos. Por ejemplo, el hecho que los pacientes del estudio del mentol presentaran una mayor severidad subjetiva de DO podría reducir el efecto producido por la estimulación con mentol. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los subgrupos en los principales parámetros estudiados, la prevalencia de penetraciones laríngeas y el tiempo de LVC. Además, el hecho que todos los estudios se realizaran con el mismo diseño experimental crea un marco sólido con el que realizar comparaciones significativas.

En resumen, la mejor estrategia terapéutica para tratar la DO, de los métodos utilizados en este estudio, es la estimulación de TRPV1 con capsaicinoides naturales, ya que tienen mayor efecto terapéutico tanto sobre los signos de la VFS como sobre la RMO que los agonistas de TRPV1/A1 o de TRPM8. Aumentar la viscosidad a pudín aumenta la seguridad de la deglución con un efecto terapéutico de magnitud similar, pero su efecto sobre la RMO es contrario al alcanzado por los agonistas de receptores TRP, por lo que el valor terapéutico de esta estrategia es menor. El efecto estimulante de los capsaicinoides puede crear sinergia con el efecto compensatorio de la viscosidad néctar, reduciendo la prevalencia tanto de los signos de seguridad como de los signos de eficacia de la deglución al reducir el tiempo de LVC y aumentar la velocidad final del bolo. Así pues, una estrategia óptima para tratar la DO en pacientes con sensibilidad orofaríngea reducida sería combinar el efecto terapéutico de las nuevas generaciones de espesantes con goma xantana con el efecto estimulante de los agonistas de TRPV1.

4. Mecanismo de acción de los estimulantes

Basándonos en los resultados discutidos en esta Tesis, hemos desarrollado hipótesis sobre el mecanismo a través del cual los agonistas farmacológicos de los receptores estudiados consiguen estimular la deglución. Para elaborar estas hipótesis hemos tenido en cuenta la localización en la que hemos encontrado los receptores estudiados y el efecto de los distintos tratamientos.

Los agonistas de TRPV1 podrían actuar tanto sobre las células epiteliales que expresan este receptor, como sobre las fibras nerviosas que presentan el receptor, tanto por debajo como por encima de la membrana basal. Cuando el TRPV1 de las células epiteliales es activado promovería la producción de anandamida (198), un segundo mensajero que puede ser liberado y activar el TRPV1 de las fibras nerviosas que se encuentran bajo la membrana basal (181,199). De esta manera, las células epiteliales podrían amplificar los estímulos químicos y dirigirlos a la terminales sensoriales aferentes.

Los agonistas de TRPA1, TRPM8 y ASIC3 pueden actuar sobre los receptores localizados en las fibras nerviosas que se encuentran tanto por debajo como por encima de la membrana basal.

En general, se puede hipotetizar que:

- a) Los agonistas químicos capaces de atravesar la barrera epitelial producirían su efecto ya sea directamente tanto sobre los nervios que se encuentran por debajo de la lámina basal como de los que están dentro del epitelio o de forma indirecta a través de la liberación de segundos mensajeros, como la anandamida, producidos por células epiteliales capaces de responder a estos agonistas (198).
- b) Los agonistas químicos que no pueden atravesar la barrera epitelial producirían su efecto directamente a través de los nervios intraepiteliales o de forma indirecta a través de segundos mensajeros (181,199).

El contacto directo entre nervios y células epiteliales observado con microscopia electrónica (36,200,201) apoya la idea de los segundos mensajeros producidos por las células epiteliales. Ya sea de forma directa o a través de segundos mensajeros, una vez excitados, los nervios sensoriales transmiten su señal hasta el tronco cerebral y de allí llegar al CPG o al córtex sensorial, pero además, también liberan factores proinflamatorios como la sustancia P o el CGRP que sensibilizan la orofaringe y facilitan la deglución y el reflejo de la tos en caso de necesitarlo (**Figura 2**).

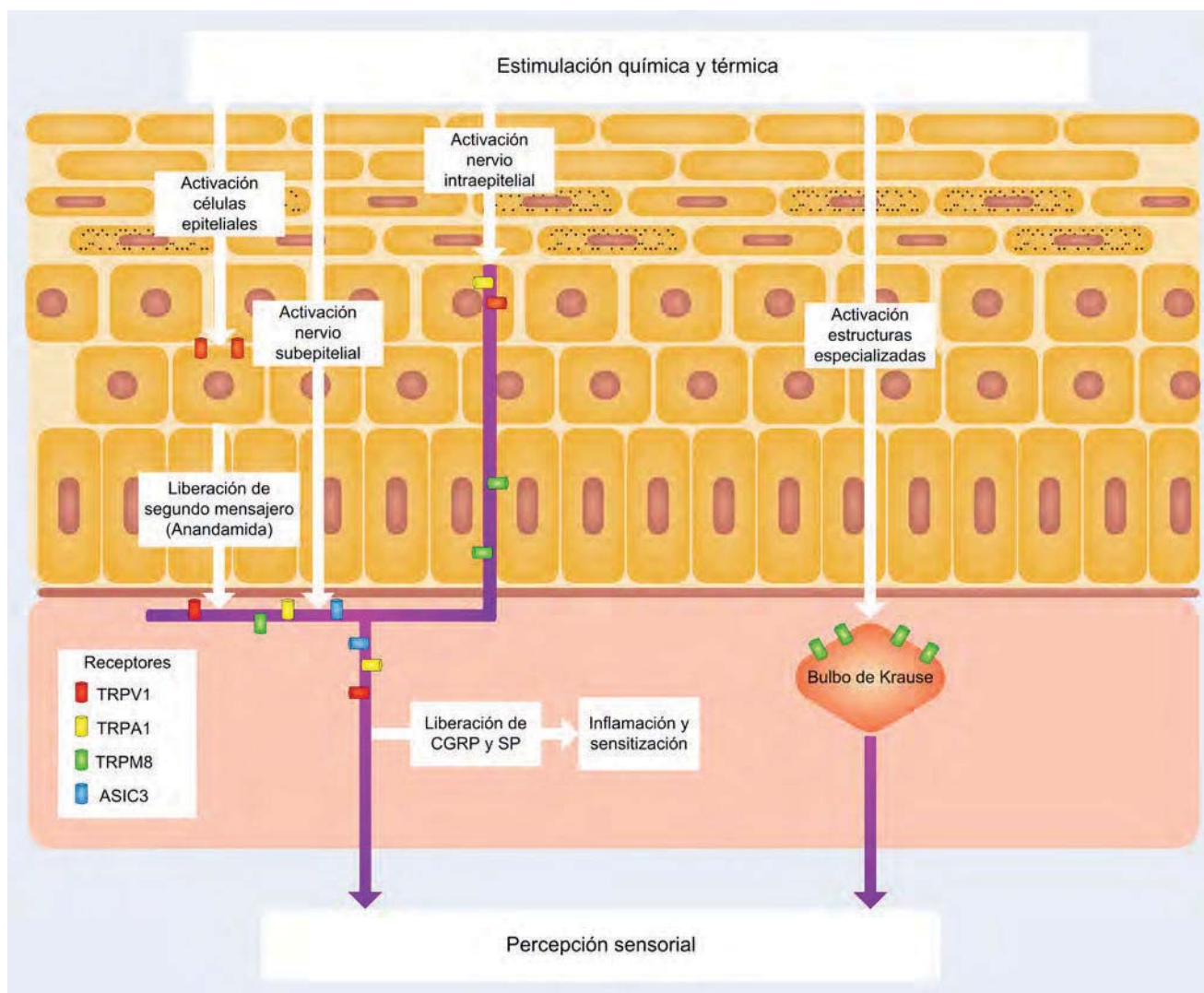


Figura 2. Esquema de los hipotéticos mecanismos de acción de los estimulantes.

Como se ha explicado previamente, los ancianos y pacientes de ictus con DO presentan una sensibilidad orofaríngea reducida, principalmente por una peor conexión entre la mucosa faríngea y el córtex sensorial y por unos patrones de activación cortical alterados (73). Por eso creemos que aumentar el estímulo a nivel periférico está compensando estas alteraciones permitiendo una RMO adecuada, lo que reduce la prevalencia de los síntomas de la DO.

La hipótesis propuesta sobre el mecanismo de acción de los agonistas también permite explicar la prevalencia de DO causada por sensibilidad reducida en pacientes con daño en la mucosa, como la mucositis producida por la radio/quimioterapia, ya que la pérdida de células epiteliales reduciría drásticamente la liberación de segundos mensajeros mientras que el edema y la fibrosis asociada con la respuesta inflamatoria dañarían las fibras nerviosas de la submucosa.

Esta hipótesis también nos ayuda a entender mejor por qué la activación de TRPV1 con capsaicinoides logra un mayor efecto terapéutico que los otros estimulantes, ya que la estimulación producida por este agonista se vería amplificada por la barrera epitelial. En cambio, la activación de TRPA1, TRPM8 o ASIC3 se produciría únicamente sobre los nervios que se encuentran, principalmente, bajo el epitelio.

5. Perspectivas de futuro

Esta Tesis sienta las bases para el desarrollo de una nueva generación de tratamientos para la DO basados en la estimulación de la deglución a través de agonistas de los receptores encontrados en orofaringe humana.

Los pacientes con DO causada por el envejecimiento o por enfermedades neurológicas presentan, mayoritariamente, una pérdida de sensibilidad orofaríngea (70-72) causada por alteraciones de la inervación tanto periféricas como centrales (73,169). Esta pérdida de sensibilidad tiene una importante repercusión tanto en la RMO como en la propulsión lingual del bolo que provocan las alteraciones de la seguridad y la eficacia en la deglución (74,195). Es por eso que cualquier nuevo tratamiento de la DO para estos grupos de pacientes debe cumplir los siguientes requisitos: ser fácil de aplicar –preferentemente junto al bolo alimentario –, asegurar una elevada adherencia y promover una reducción significativa en el tiempo de LVC, un parámetro crítico para la seguridad de la deglución (164).

Los agonistas pueden administrarse juntamente con los líquidos a la viscosidad requerida por el paciente antes de la comida para aprovechar los fenómenos de sensitización desencadenados por la activación de estos receptores. Además, como se ha observado previamente, la activación a largo plazo de estos receptores puede promover fenómenos de plasticidad cerebral que mejoren la excitabilidad de las neuronas que inervan la orofaringe y aumenten la presencia y liberación de neuropéptidos como la sustancia P y CGRP (88).

Nuestro grupo ha comprobado que la respuesta a un tratamiento de estimulación sensorial con agonistas de receptores TRP no tiene un efecto uniforme en todos los pacientes (113). Es por eso que antes de aplicar esta nueva línea de tratamientos sería recomendable determinar si el paciente responderá al tratamiento de la manera esperada. Posiblemente la detección de sustancia P o CGRP en saliva (202,203) permita establecer de forma sencilla si un paciente es candidato a ser tratado con agonistas de TRP.

Esta tesis abre así dos líneas de investigación futura. Por un lado, la búsqueda de más receptores que se expresen y/o se encuentren localizados en la mucosa orofaríngea y que al ser activados o inhibidos aumenten la sensibilidad de la inervación orofaríngea durante la deglución. Por otro lado, la búsqueda de un sistema sencillo y no invasivo que permita saber de antemano si un paciente con DO se puede beneficiar de un tratamiento basado en la activación de receptores sensoriales y permita definir los subtipos respondedor/no respondedor.

En el futuro, el tratamiento de pacientes con DO asociada a las enfermedades neurológicas y al envejecimiento se realizará de forma personalizada, con un estudio integral de la fisiopatología del paciente que nos permita iniciar el mejor tratamiento; desde la compensación de los tratamientos actuales a la rehabilitación de la función deglutoria de los tratamientos futuros.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La inervación sensorial de la orofaringe humana se encuentra principalmente por debajo de la membrana basal, ya sea en terminales libres o estructuras sensoriales especializadas. Aunque hemos observado algunos nervios intraepiteliales, estos se encuentran en menor proporción que por debajo de la membrana basal.
2. Los receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8 y ASIC3 se encuentran expresados y/o localizados en orofaringe humana.
 - 2.1. Mediante técnicas de biología molecular hemos observado expresión (mRNA) de TRPV1, TRPA1 y ASIC3 en las regiones inervadas por los NC V, IX y X en la mucosa orofaríngea humana de individuos sanos; en cambio no hemos encontrado expresión de TRPM8 en las muestras estudiadas. TRPV1 es el que presenta el mayor nivel de expresión de los receptores estudiados.
 - 2.2. Mediante técnicas de inmunohistoquímica hemos observado localización (proteína) de TRPV1, TRPA1, TRPM8 y ASIC3 en las regiones inervadas por los NC V, IX y X en la mucosa orofaríngea humana. Su patrón de localización presenta diferencias claras, siendo TRPV1 un receptor encontrado principalmente en las células epiteliales situadas por encima de la membrana basal, mientras que el resto de receptores se encuentran principalmente bajo la membrana basal en los terminales nerviosos que inervan la mucosa.
3. Las células PC-3 son un modelo válido para estudiar la farmacodinámica de los agonistas de TRPV1.
 - 3.1. La capsaicina, la piperina los capsaicinoides estimulan los canales TRPV1 de una forma concentración dependiente. Los capsaicinoides presentan un efecto máximo inferior al del resto de agonistas.
 - 3.2. Todos los agonistas TRPV1 estudiados muestran fenómenos de desensitización por exposición repetida.
 - 3.3. La incubación con un antagonista específico de TRPV1 abole el efecto de los agonistas estudiados, lo que demuestra que su efecto se produce de forma específica a través de este receptor.
4. La estimulación de los receptores TRPV1, TRPA1 y TRPM8 con agonistas añadidos al bolo alimentario reduce la prevalencia de signos videofluoroscópicos de alteración de la seguridad en la deglución a un nivel similar al efecto terapéutico observado al aumentar la viscosidad del bolo. El mecanismo terapéutico del tratamiento farmacéutico es el opuesto al que se consigue aumentando la viscosidad del bolo; mientras que la estimulación mejora la respuesta deglutoria, el aumento de la viscosidad sólo compensa la respuesta alterada en estos pacientes retrasando aún más la deglución.
 - 4.1. La estimulación de TRPV1 con capsaicinoides es el tratamiento con mayor efecto terapéutico, reduciendo tanto la prevalencia de signos de alteración de la seguridad como la prevalencia de signos de alteración de la eficacia. La estimulación de TRPM8 con mentol es el tratamiento con menor efecto terapéutico en pacientes ancianos, post-ictus y con enfermedades neurodegenerativas con DO.

- 4.2. La estimulación de TRPV1 con capsaicinoides tiene el mayor efecto terapéutico probablemente gracias a la potencial función amplificadora de las células epiteliales que expresan TRPV1 en la mucosa orofaríngea humana.
5. El futuro tratamiento de la DO en pacientes con pérdida de sensibilidad orofaríngea se basará en la adición de estimulantes naturales de la deglución en el bolo alimentario. Esto originará un cambio en el paradigma de tratamiento desde el efecto compensador de los estimulantes hasta el efecto estimulante de estos fármacos: de la compensación a la recuperación de la función deglutoria.



REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Standring S, Borley NR, Collins P, Crossman AR, Gatzoulis MA, Healy JC, et al. Oral Cavity. In: Gray's Anatomy The anatomical basis of clinical practice. 40th Ed. Amsterdam: Elsevier; 2008. p. 885–938.
2. Sanders I, Mu L. A three-dimensional atlas of human tongue muscles. *Anat Rec (Hoboken)*. 2013 Jul;296(7):1102–14.
3. Norton NS. *Netter's Head and Neck Anatomy for Dentistry*. 2nd Ed. Philadelphia: Elsevier; 2011.
4. Standring S, Borley NR, Collins P, Crossman AR, Gatzoulis MA, Healy JC, et al. Pharynx. In: Gray's Anatomy The anatomical basis of clinical practice. 40th Ed. Amsterdam: Elsevier; 2008. p. 1000–31.
5. Standring S, Borley NR, Collins P, Crossman AR, Gatzoulis MA, Healy JC, et al. Larynx. In: Gray's Anatomy The anatomical basis of clinical practice. 40th Ed. Amsterdam: Elsevier; 2008. p. 1032–81.
6. Singh S, Hamdy S. The upper oesophageal sphincter. *Neurogastroenterol Motil*. 2005 Jun;17 Suppl 1(s1):3–12.
7. Ruiz de León A, Farré Martí R. Función motora esofágica. In: Lacima Vidal G, Serra Pueyo J, Mínguez Pérez M, Accarino Garaventa A, editors. *Tratado de Neurogastroenterología y Motilidad Digestiva*. Madrid: Panamericana; 2015. p. 112–22.
8. Mu L, Sanders I. Sensory nerve supply of the human oro- and laryngopharynx: A preliminary study. *Anat Rec*. 2000;258(4):406–20.
9. Zur KB, Mu L, Sanders I. Distribution Pattern of the Human Lingual Nerve. *Clin Anat*. 2004;17(2):88–92.
10. Doty RL, Cummins DM, Shibanova A, Sanders I, Mu L. Lingual distribution of the human glossopharyngeal nerve. *Acta Otolaryngol*. 2009;129(1):52–6.
11. Yatake Y, Hiroto I. Anatomical Study on the Laryngeal Nerves of Mammals. *Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*. 1968;71(2):212–6.
12. Sanders I, Mu L. Anatomy of the human internal superior laryngeal nerve. *Anat Rec*. 1998 Dec;252(4):646–56.
13. Gartner LP. Oral anatomy and tissue types. *Semin Dermatol*. 1994 Jun;13(2):68–73.
14. Squier CA, Kremer MJ. Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2001;(29):7–15.
15. Stone LM, Finger TE, Tam PP, Tan SS. Taste receptor cells arise from local epithelium, not neurogenic ectoderm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Mar 14;92(6):1916–20.
16. Okubo T, Clark C, Hogan BLM. Cell lineage mapping of taste bud cells and keratinocytes in the mouse tongue and soft palate. *Stem Cells*. 2009;27(2):442–50.
17. Roper SD. The cell biology of vertebrate taste receptors. *Annu Rev Neurosci*. 1989;12:329–53.
18. Chaudhari N, Roper SD. The cell biology of taste. *J Cell Biol*. 2010;190(3):285–96.
19. Vandenbeuch A, Clapp TR, Kinnamon SC. Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse. *BMC Neurosci*. 2008;9:1.
20. Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, et al. Coding of sweet, bitter, and umami tastes: Different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*. 2003;112(3):293–301.

21. Tomchik SM, Berg S, Kim JW, Chaudhari N, Roper SD. Breadth of tuning and taste coding in mammalian taste buds. *J Neurosci*. 2007;27(40):10840–8.
22. Yee CL, Yang R, Böttger B, Finger TE, Kinnamon JC. “Type III” cells of rat taste buds: immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5, and serotonin. *J Comp Neurol*. 2001 Nov 5;440(1):97–108.
23. Witt M, Reutter K. Scanning electron microscopical studies of developing gustatory papillae in humans. *Chem Senses*. 1997;22(6):601–12.
24. Watanabe I. Fine structure of lamellated nerve endings in the gingiva of man and the Cebus apella monkey. *Okajimas Folia Anat Jpn*. 1982;59(2–3):181–98.
25. Watanabe I, Yamada E. The fine structure of lamellated nerve endings found in the rat gingiva. *Arch Histol Jpn Nippon soshikigaku kiroku*. 1983;46(2):173–82.
26. Watanabe I, Yamada E. A light and electron microscopic study of lamellated nerve endings found in the rat cheek mucosa. *Arch Histol Jpn*. 1985 Dec;48(5):497–504.
27. Munger BL, Ide C. The structure and function of cutaneous sensory receptors. *Arch Histol Cytol*. 1988 Mar;51(1):1–34.
28. Watanabe I. Ultrastructures of mechanoreceptors in the oral mucosa. *Anat Sci Int / Japanese Assoc Anat*. 2004;79(2):55–61.
29. Smith KR. The ultrastructure of the human Haarscheibe and Merkel cell. *J Invest Dermatol*. 1970 Feb;54(2):150–9.
30. Hashimoto K. Fine structure of Merkel cell in human oral mucosa. *J Invest Dermatol*. 1972 Jun;58(6):381–7.
31. Toyoshima K, Miyamoto K, Itoh A, Shimamura A. Merkel-neurite complexes in the fungiform papillae of two species of monkeys. *Cell Tissue Res*. 1987;250(1):237–9.
32. Bengoechea Gonzalez ME, Alvarez Arenal A, Perez Casas A, Suarez Garnacho S, Vega Alvarez A, Villa Vigil A. Microscopic innervation and nerve receptors of the lingual mucosa. *Rev Eur Odontoestomatol*. 1989;1(2):123–30.
33. Chouchkov CN. On the fine structure of Krause’s bulbs in human skin, oral cavity and rectum. *Arch Histol Jpn Nippon soshikigaku kiroku*. 1973;35(5):365–75.
34. Lawrenson JG, Ruskell GL. The structure of corpuscular nerve endings in the limbal conjunctiva of the human eye. *J Anat*. 1991;177:75–84.
35. Munger BL. The intraepidermal innervation of the snout skin of the opossum. A light and electron microscope study, with observations on the nature of Merkel’s Tastzellen. *J Cell Biol*. 1965 Jul;26(1):79–97.
36. Chiba T, Watanabe S, Shin T. Ultrastructure of the glomerular corpuscular nerve endings in the subepithelium of human epiglottis. *Arch Histol Jpn Nippon soshikigaku kiroku*. 1985;48(2):213–21.
37. Kahrilas PJ, Lin S, Chen J, Logemann JA. Oropharyngeal accommodation to swallow volume. *Gastroenterology*. 1996;111(2):297–306.
38. Jean A. Brain stem control of swallowing: neuronal network and cellular mechanisms. *Physiol Rev*. 2001 Apr;81(2):929–69.

39. Logemann JA. Mechanisms of Normal and Abnormal Swallowing. In: Flint PW, Haughey BH, Lund VJ, Niparko JK, Richardson MA, Robbins KT, et al. Cummings Otolaryngology Head & Neck Surgery. 5th Ed. Philadelphia: Elsevier; 2010. p. 1215–21.
40. Massey BT. Physiology of oral cavity, pharynx and upper esophageal sphincter. *GI Motility online*. Nature Publishing Group; 2006 [cited 2017 Apr 5]. Available from: <https://www.nature.com/gimo/contents/pt1/full/gimo2.html>
41. Volkert D, Berner YN, Berry E, Cederholm T, Coti Bertrand P, Milne A, et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Geriatrics. *Clin Nutr*. 2006 Apr;25(2):330–60.
42. Kahrilas PJ, Lin S, Rademaker AW, Logemann JA. Impaired deglutitive airway protection: A videofluoroscopic analysis of severity and mechanism. *Gastroenterology*. 1997;113(5):1457–64.
43. Rofes L, Arreola V, Almirall J, Cabré M, Campins L, García-Peris P, et al. Diagnosis and management of oropharyngeal Dysphagia and its nutritional and respiratory complications in the elderly. *Gastroenterol Res Pract*. 2011;2011:1–13.
44. Logemann JA, Kahrilas PJ, Cheng J, Pauloski BR, Gibbons PJ, Rademaker AW, et al. Closure mechanisms of laryngeal vestibule during swallow. *Am J Physiol*. 1992 Feb;262(2 Pt 1):G338–44.
45. Kahrilas PJ, Logemann JA, Lin S, Ergun GA. Pharyngeal clearance during swallowing: a combined manometric and videofluoroscopic study. *Gastroenterology*. 1992 Jul;103(1):128–36.
46. Clavé P, Shaker R. Dysphagia: current reality and scope of the problem. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015 May;12(5):259–70.
47. Schindler JS, Kelly JH. Swallowing disorders in the elderly. *Laryngoscope*. 2002 Apr;112(4):589–602.
48. Hamdy S, Aziz Q, Rothwell JC, Singh KD, Barlow J, Hughes DG, et al. The cortical topography of human swallowing musculature in health and disease. *Nat Med*. 1996 Nov;2(11):1217–24.
49. Teismann IK, Suntrup S, Warnecke T, Steinsträter O, Fischer M, Flöel A, et al. Cortical swallowing processing in early subacute stroke. *BMC Neurol*. 2011 Mar 11;11(1):34.
50. Clavé P, Terré R, de Kraa M, Serra M. Approaching oropharyngeal dysphagia. *Rev Esp Enferm Dig*. 2004;96(2):119–31.
51. World Health Organization. International Classification of Diseases (ICD); 2010.
52. Rasley A, Logemann JA, Kahrilas PJ, Rademaker AW, Pauloski BR, Dodds WJ. Prevention of barium aspiration during videofluoroscopic swallowing studies: value of change in posture. *AJR Am J Roentgenol*. 1993 May;160(5):1005–9.
53. Bloem BR, Lagaay AM, van Beek W, Haan J, Roos RA, Wintzen AR. Prevalence of subjective dysphagia in community residents aged over 87. *BMJ*. 1990 Mar 17;300(6726):721–2.
54. Kawashima K, Motohashi Y, Fujishima I. Prevalence of dysphagia among community-dwelling elderly individuals as estimated using a questionnaire for dysphagia screening. *Dysphagia*. 2004;19(4):266–71.
55. Roy N, Stemple J, Merrill RM, Thomas L. Dysphagia in the elderly: preliminary evidence of prevalence, risk factors, and socioemotional effects. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2007 Nov;116(11):858–65.
56. Holland G, Jayasekeran V, Pendleton N, Horan M, Jones M, Hamdy S. Prevalence and symptom profiling of oropharyngeal dysphagia in a community dwelling of an elderly population: a self-reporting questionnaire survey. *Dis esophagus Off J Int Soc Dis Esophagus*. 2011 Sep;24(7):476–80.

57. Yang EJ, Kim MH, Lim J, Paik N-J. Oropharyngeal Dysphagia in a community-based elderly cohort: the Korean longitudinal study on health and aging. *J Korean Med Sci.* 2013 Oct;28(10):1534–9.
58. Serra-Prat M, Hinojosa G, López D, Juan M, Fabrè E, Voss DS, et al. Prevalence of oropharyngeal dysphagia and impaired safety and efficacy of swallow in independently living older persons. *J Am Geriatr Soc.* 2011;59(1):186–7.
59. Lee A, Sitoh YY, Lieu PK, Phua SY, Chin JJ. Swallowing impairment and feeding dependency in the hospitalised elderly. *Ann Acad Med Singapore.* 1999 May;28(3):371–6.
60. Cabre M, Serra-Prat M, Palomera E, Almirall J, Pallares R, Clave P. Prevalence and prognostic implications of dysphagia in elderly patients with pneumonia. *Age Ageing.* 2010 Jan 1;39(1):39–45.
61. Nogueira D, Reis E. Swallowing disorders in nursing home residents: how can the problem be explained? *Clin Interv Aging.* 2013 Feb;8:221–7.
62. Lin LC, Wu SC, Chen HS, Wang TG, Chen MY. Prevalence of impaired swallowing in institutionalized older people in Taiwan. *J Am Geriatr Soc.* 2002;50(6):1118–23.
63. Horner J, Alberts MJ, Dawson D V, Cook GM. Swallowing in Alzheimer's disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1994;8(3):177–89.
64. Langmore SE, Olney RK, Lomen-Hoerth C, Miller BL. Dysphagia in patients with frontotemporal lobar dementia. *Arch Neurol.* 2007;64(1):58–62.
65. Suh MK, Kim H, Na DL. Dysphagia in patients with dementia: Alzheimer versus vascular. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2009 Apr;23(2):178–84.
66. Kalf JG, de Swart BJM, Bloem BR, Munneke M. Prevalence of oropharyngeal dysphagia in Parkinson's disease: a meta-analysis. *Parkinsonism Relat Disord.* 2012 May;18(4):311–5.
67. Martino R, Foley N, Bhogal S, Diamant N, Speechley M, Teasell R. Dysphagia after stroke: Incidence, diagnosis, and pulmonary complications. *Stroke.* 2005;36(12):2756–63.
68. Nagaya M, Sumi Y. Reaction time in the submental muscles of normal older people. *J Am Geriatr Soc.* 2002 May;50(5):975–6.
69. Clavé P, De Kraa M, Arreola V, Girvent M, Farré R, Palomera E, et al. The effect of bolus viscosity on swallowing function in neurogenic dysphagia. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24(9):1385–94.
70. Aviv JE. Effects of aging on sensitivity of the pharyngeal and supraglottic areas. *Am J Med.* 1997;103(5 A):74S–76S.
71. Aviv JE, Martin JH, Sacco RL, Zagar D, Diamond B, Keen MS, et al. Supraglottic and pharyngeal sensory abnormalities in stroke patients with dysphagia. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1996 Feb;105(2):92–7.
72. Hammer MJ, Murphy CA, Abrams TM. Airway somatosensory deficits and dysphagia in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis.* 2013 Jan;3(1):39–44.
73. Rofes L, Ortega O, Vilardell N, Mundet L, Clavé P. Spatiotemporal characteristics of the pharyngeal event-related potential in healthy subjects and older patients with oropharyngeal dysfunction. *Neurogastroenterol Motil.* 2017 Feb 2;29(2).
74. Alvarez-Berdugo D, Rofes L, Casamitjana JF, Padrón A, Quer M, Clavé P. Oropharyngeal and laryngeal sensory innervation in the pathophysiology of swallowing disorders and sensory stimulation treatments. *Ann N Y Acad Sci.* 2016; 1380(1):1–17.

75. Robbins J, Gangnon RE, Theis SM, Kays SA, Hewitt AL, Hind JA. The Effects of Lingual Exercise on Swallowing in Older Adults. *J Am Geriatr Soc.* 2005 Sep;53(9):1483–9.
76. Clavé P. Disfagia orofaríngea en el anciano. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 2012;47(4):139–40.
77. Serra-Prat M, Palomera M, Gomez C, Sar-Shalom D, Saiz A, Montoya JG, et al. Oropharyngeal dysphagia as a risk factor for malnutrition and lower respiratory tract infection in independently living older persons: A population-based prospective study. *Age Ageing.* 2012;41(3):376–81.
78. Carrión S, Cabré M, Monteis R, Roca M, Palomera E, Serra-Prat M, et al. Oropharyngeal dysphagia is a prevalent risk factor for malnutrition in a cohort of older patients admitted with an acute disease to a general hospital. *Clin Nutr.* 2015 Jun;34(3):436–42.
79. Botella Trelis JJ, Ferrero López MI. Manejo de la disfagia en el anciano institucionalizado: situación actual. *Nutr Hosp.* 17(3):168–74.
80. Suominen M, Muurinen S, Routasalo P, Soini H, Suur-Uski I, Peiponen A, et al. Malnutrition and associated factors among aged residents in all nursing homes in Helsinki. *Eur J Clin Nutr.* 2005 Apr 3;59(4):578–83.
81. Sheard JM, Ash S, Silburn PA, Kerr GK. Prevalence of malnutrition in Parkinson's disease: a systematic review. *Nutr Rev.* 2011 Sep;69(9):520–32.
82. Ortega Fernández O, Clavé P. Oral Hygiene, Aspiration, and Aspiration Pneumonia: From Pathophysiology to Therapeutic Strategies. *Curr Phys Med Rehabil Reports.* Springer US; 2013 Dec 5;1(4):292–5.
83. Kohno S, Matsushima T, Saito A, Nakata K, Yamaguchi K, Watanabe A, et al. The committee for The Japanese Respiratory Society guidelines in management of respiratory infections. Aspiration pneumonia. *Respirology.* 2004;9(Suppl):S35–7.
84. Cook IJ, Kahrilas PJ. AGA technical review on management of oropharyngeal dysphagia. *Gastroenterology.* 1999 Feb;116(2):455–78.
85. Reza Shariatzadeh M, Huang JQ, Marrie TJ. Differences in the Features of Aspiration Pneumonia According to Site of Acquisition: Community or Continuing Care Facility. *J Am Geriatr Soc.* 2006 Feb;54(2):296–302.
86. Ickenstein GW. *Diagnosis and Treatment of Neurogenic Dysphagia.* 1st Ed. Bremen: UNI-MED science; 2011. 94 p.
87. Rofes L, Cola P, Clavé P. The effects of sensory stimulation on neurogenic oropharyngeal dysphagia. *J Gastroenterol Hepatol Res.* 2014;3(5):1066–72.
88. Bonham AC, Sekizawa S, Chen C-Y, Joad JP. Plasticity of brainstem mechanisms of cough. *Respir Physiol Neurobiol.* 2006 Jul 28;152(3):312–9.
89. Pommerenke WT. A study of the sensory areas eliciting the swallowing reflexes. *Am J Physiol.* 1927;84(1):36–41.
90. Kaatzke-McDonald MN, Post E, Davis PJ. The effects of cold, touch, and chemical stimulation of the anterior faucial pillar on human swallowing. *Dysphagia.* 1996 Jan;11(3):198–206.
91. de Lama Lazzara G, Lazarus C, Logemann JA. Impact of thermal stimulation on the triggering of the swallowing reflex. *Dysphagia.* Springer-Verlag; 1986 Jun;1(2):73–7.

92. Regan J, Walshe M, Tobin WO. Immediate effects of thermal-tactile stimulation on timing of swallow in idiopathic Parkinson's disease. *Dysphagia*. 2010 Sep 26;25(3):207–15.
93. Theurer JA, Johnston JL, Fisher J, Darling S, Stevens RC, Taves D, et al. Proof-of-principle pilot study of oropharyngeal air-pulse application in individuals with dysphagia after hemispheric stroke. *Arch Phys Med Rehabil*. 2013 Jun;94(6):1088–94.
94. Watando A, Ebihara S, Ebihara T, Okazaki T, Takahashi H, Asada M, et al. Effect of temperature on swallowing reflex in elderly patients with aspiration pneumonia. *J Am Geriatr Soc*. 2004 Dec;52(12):2143–4.
95. Sciortino K, Liss JM, Case JL, Gerritsen KGM, Katz RC. Effects of mechanical, cold, gustatory, and combined stimulation to the human anterior faucial pillars. *Dysphagia*. 2003 Feb 1;18(1):16–26.
96. Kitagawa J-I, Shingai T, Takahashi Y, Yamada Y. Pharyngeal branch of the glossopharyngeal nerve plays a major role in reflex swallowing from the pharynx. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002 May;282(5):R1342-7.
97. Kitagawa J, Nakagawa K, Hasegawa M, Iwakami T, Shingai T, Yamada Y, et al. Facilitation of reflex swallowing from the pharynx and larynx. *J Oral Sci*. 2009 Jun;51(2):167–71.
98. Fraser C, Power M, Hamdy S, Rothwell J, Hobday D, Hollander I, et al. Driving plasticity in human adult motor cortex is associated with improved motor function after brain injury. *Neuron*. 2002;34(5):831–40.
99. Jayasekeran V, Singh S, Tyrrell P, Michou E, Jefferson S, Mistry S, et al. Adjunctive functional pharyngeal electrical stimulation reverses swallowing disability after brain lesions. *Gastroenterology*. 2010 May;138(5):1737–46.
100. Freed ML, Freed L, Chatburn RL, Christian M. Electrical stimulation for swallowing disorders caused by stroke. *Respir Care*. 2001 May;46(5):466–74.
101. Gallas S, Marie JP, Leroi AM, Verin E. Sensory transcutaneous electrical stimulation improves post-stroke dysphagic patients. *Dysphagia*. 2010 Dec 24;25(4):291–7.
102. Rofes L, Arreola V, López I, Martín A, Sebastián M, Ciurana A, et al. Effect of surface sensory and motor electrical stimulation on chronic poststroke oropharyngeal dysfunction. *Neurogastroenterol Motil*. 2013;25(11):888-E701.
103. Oh B-M, Kim D-Y, Paik N-J. Recovery of swallowing function is accompanied by the expansion of the cortical map. *Int J Neurosci*. 2007 Sep 7;117(9):1215–27.
104. Logemann JA, Pauloski BR, Colangelo L, Lazarus C, Fujiu M, Kahrilas PJ. Effects of a sour bolus on oropharyngeal swallowing measures in patients with neurogenic dysphagia. *J Speech Hear Res*. 1995 Jun;38(3):556–63.
105. Pauloski BR, Logemann JA, Rademaker AW, Lundy D, Sullivan PA, Newman LA, et al. Effects of enhanced bolus flavors on oropharyngeal swallow in patients treated for head and neck cancer. *Head Neck*. 2013 Aug;35(8):1124–31.
106. Pelletier CA, Lawless HT. Effect of citric acid and citric acid-sucrose mixtures on swallowing in neurogenic oropharyngeal dysphagia. *Dysphagia*. 2003 Oct 1;18(4):231–41.
107. Cola PC, Gatto AR, Silva RG da, Spadotto AA, Schelp AO, Henry MAC de A. The influence of sour taste and cold temperature in pharyngeal transit duration in patients with stroke. *Arq Gastroenterol*. 2010;47(1):18–21.

108. Gatto AR, Cola PC, Silva RG da, Spadotto AA, Ribeiro PW, Schelp AO, et al. Sour taste and cold temperature in the oral phase of swallowing in patients after stroke. *CoDAS*. 2013;25(2):164–8.
109. Kajii Y, Shingai T, Kitagawa J, Takahashi Y, Taguchi Y, Noda T, et al. Sour taste stimulation facilitates reflex swallowing from the pharynx and larynx in the rat. *Physiol Behav*. 2002 Nov;77(2–3):321–5.
110. Ebihara T, Sekizawa K, Nakazawa H, Sasaki H. Capsaicin and swallowing reflex. *Lancet (London, England)*. 1993 Feb 13;341(8842):432.
111. Rofes L, Arreola V, Martin A, Clavé P. Natural capsaicinoids improve swallow response in older patients with oropharyngeal dysphagia. *Gut*. 2013 Sep;62(9):1280–7.
112. Ebihara T, Takahashi H, Ebihara S, Okazaki T, Sasaki T, Watando A, et al. Capsaicin troche for swallowing dysfunction in older people. *J Am Geriatr Soc*. 2005;53(5):824–8.
113. Ortega O, Rofes L, Martin A, Arreola V, López I, Clavé P. A Comparative Study Between Two Sensory Stimulation Strategies After Two Weeks Treatment on Older Patients with Oropharyngeal Dysphagia. *Dysphagia*. 2016 Oct 9;31(5):706–16.
114. Ebihara T, Ebihara S, Maruyama M, Kobayashi M, Itou A, Arai H, et al. A randomized trial of olfactory stimulation using black pepper oil in older people with swallowing dysfunction. *J Am Geriatr Soc*. 2006;54(9):1401–6.
115. Rofes L, Arreola V, Martin A, Clavé P. Effect of oral piperine on the swallow response of patients with oropharyngeal dysphagia. *J Gastroenterol*. 2014 Dec;49(12):1517–23.
116. Nakagawa T, Ohru T, Sekizawa K, Sasaki H. Sputum substance P in aspiration pneumonia. *Lancet (London, England)*. 1995 Jun 3;345(8962):1447.
117. Ebihara T, Ebihara S, Watando A, Okazaki T, Asada M, Ohru T, et al. Effects of menthol on the triggering of the swallowing reflex in elderly patients with dysphagia. *Br J Clin Pharmacol*. 2006;62(3):369–71.
118. Bülow M, Olsson R, Ekberg O. Videoradiographic analysis of how carbonated thin liquids and thickened liquids affect the physiology of swallowing in subjects with aspiration on thin liquids. *Acta Radiol*. 2003 Jul;44(4):366–72.
119. Sdravou K, Walshe M, Dagdilelis L. Effects of carbonated liquids on oropharyngeal swallowing measures in people with neurogenic dysphagia. *Dysphagia*. 2012 Jun;27(2):240–50.
120. Wang YY, Chang RB, Liman ER. TRPA1 is a component of the nociceptive response to CO₂. *J Neurosci*. 2010 Sep 29;30(39):12958–63.
121. Michou E, Mastan A, Ahmed S, Mistry S, Hamdy S. Examining the role of carbonation and temperature on water swallowing performance: a swallowing reaction-time study. *Chem Senses*. 2012 Nov 1;37(9):799–807.
122. Denda M, Fuziwara S, Inoue K, Denda S, Akamatsu H, Tomitaka A, et al. Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Aug 3;285(5):1250–2.
123. Caterina MJ, Schumacher M a, Tominaga M, Rosen T a, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;389(6653):816–24.
124. Cortright DN, Crandall M, Sanchez JF, Zou T, Krause JE, White G. The tissue distribution and functional characterization of human VR1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;281(5):1183–9.

125. Ugawa S, Ueda T, Yamamura H, Nagao M, Shimada S. Coexpression of vanilloid receptor subtype-1 and acid-sensing ion channel genes in the human trigeminal ganglion neurons. *Chem Senses*. 2005;30(Suppl 1):195.
126. Shabir S, Cross W, Kirkwood LA, Pearson JF, Appleby PA, Walker D, et al. Functional expression of purinergic P2 receptors and transient receptor potential channels by the human urothelium. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;305(3):F396-406.
127. Szallasi A, Cortright DN, Blum C a, Eid SR. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(5):357–72.
128. Van Gerven L, Alpizar YA, Wouters MM, Hox V, Hauben E, Jorissen M, et al. Capsaicin treatment reduces nasal hyperreactivity and transient receptor potential cation channel subfamily V, receptor 1 (TRPV1) overexpression in patients with idiopathic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 May;133(5):1332–1339.e3.
129. Kedei N, Szabo T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ, et al. Analysis of the Native Quaternary Structure of Vanilloid Receptor 1. *J Biol Chem*. 2001 Jul 20;276(30):28613–9.
130. Mosavi LK, Minor DL, Peng Z -y. Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif. *Proc Natl Acad Sci*. 2002 Dec 10;99(25):16029–34.
131. Rosenbaum T, Gordon-Shaag A, Munari M, Gordon SE. Ca^{2+} /Calmodulin Modulates TRPV1 Activation by Capsaicin. *J Gen Physiol*. 2004 Jan;123(1):53–62.
132. Rathee PK, Distler C, Obreja O, Neuhuber W, Wang GK, Wang S-Y, et al. PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *J Neurosci*. 2002 Jun 1;22(11):4740–5.
133. Rosenbaum T, Simon SA. TRPV1 Receptors and Signal Transduction. In: *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. CRC Press/Taylor & Francis; 2007.
134. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*. 2003;112(6):819–29.
135. Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Högestätt ED, et al. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(34):12248–52.
136. Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Tokunaga A, et al. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with A δ /C-fibers and colocalization with Trk receptors. *J Comp Neurol*. 2005;493(4):596–606.
137. García-Añoveros J, Duggan A. TRPA1 in Auditory and Nociceptive Organs. In: *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. CRC Press/Taylor & Francis; 2007.
138. Atoyán R, Shander D, Botchkareva N V. Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin. *J Invest Dermatol*. 2009 Sep;129(9):2312–5.
139. Mukhopadhyay I, Gomes P, Aranake S, Shetty M, Karnik P, Damle M, et al. Expression of functional TRPA1 receptor on human lung fibroblast and epithelial cells. *J Recept Signal Transduct*. 2011;31(5):350–8.
140. Corey DP, García-Añoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin S-Y, Vollrath MA, et al. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature*. 2004 Dec 9;432(7018):723–30.

141. Karashima Y, Damann N, Prenen J, Talavera K, Segal A, Voets T, et al. Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. *J Neurosci*. 2007;27(37):9874–84.
142. Sotomayor M, Corey DP, Schulten K. In Search of the Hair-Cell Gating Spring. *Structure*. 2005 Apr;13(4):669–82.
143. Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, et al. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*. 2002;108(5):705–15.
144. Yee N. Roles of TRPM8 Ion Channels in Cancer: Proliferation, Survival, and Invasion. *Cancers (Basel)*. 2015 Oct 23;7(4):2134–46.
145. Phelps CB, Gaudet R. The role of the N terminus and transmembrane domain of TRPM8 in channel localization and tetramerization. *J Biol Chem*. 2007 Dec 14;282(50):36474–80.
146. Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*. 1999;398(6726):436–41.
147. Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, et al. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature*. 2002 Jul 11;418(6894):181–6.
148. Alessandri-Haber N, Yeh JJ, Boyd AE, Parada CA, Chen X, Reichling DB, et al. Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. *Neuron*. 2003 Jul 31;39(3):497–511.
149. Alessandri-Haber N, Dina OA, Chen X, Levine JD. TRPC1 and TRPC6 channels cooperate with TRPV4 to mediate mechanical hyperalgesia and nociceptor sensitization. *J Neurosci*. 2009 May 13;29(19):6217–28.
150. Sasaki R, Sato T, Yajima T, Kano M, Suzuki T, Ichikawa H. The Distribution of TRPV1 and TRPV2 in the rat pharynx. *Cell Mol Neurobiol*. 2013;33(5):707–14.
151. Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, et al. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science*. 2002;296(5575):2046–9.
152. Chung M-K, Lee H, Mizuno A, Suzuki M, Caterina MJ. TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes. *J Biol Chem*. 2004 May 14;279(20):21569–75.
153. Xu H, Delling M, Jun JC, Clapham DE. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci*. 2006 May;9(5):628–35.
154. Delany NS, Hurle M, Facer P, Alnadaf T, Plumpton C, Kinghorn I, et al. Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2. *Physiol Genomics*. 2001 Jan 19;4(3):165–74.
155. Page AJ, Brierley SM, Martin CM, Price MP, Symonds E, Butler R, et al. Different contributions of ASIC channels 1a, 2, and 3 in gastrointestinal mechanosensory function. *Gut*. 2005;54(10):1408–15.
156. Huque T, Cowart BJ, Dankulich-Nagrudny L, Pribitkin EA, Bayley DL, Spielman AI, et al. Sour ageusia in two individuals implicates ion channels of the ASIC and PKD families in human sour taste perception at the anterior tongue. *PLoS One*. 2009;4(10):e7347.
157. Bautista DM, Sigal YM, Milstein AD, Garrison JL, Zorn JA, Tsuruda PR, et al. Pungent agents from Szechuan peppers excite sensory neurons by inhibiting two-pore potassium channels. *Nat Neurosci*. 2008;11(7):772–9.
158. Jedwab MR, Roughead ZK, Kaspar KM, Sanchez A, Hartmann C, Loret C, et al. Method of diagnosing and treating dysphagia. Switzerland; US8696568 B2, 2014. p. 1–18.

159. Ebihara T, Ebihara S, Shimagami Y. Agent for amelioration of dysphagia, and pharmaceutical or food composition comprising the same. Japan; US9420817 B2, 2016. p. 1–6.
160. Ebihara S, Ebihara T, Gui P, Osaka K, Sumi Y, Kohzuki M. Thermal taste and anti-aspiration drugs: a novel drug discovery against pneumonia. *Curr Pharm Des.* 2014;20(16):2755–9.
161. Dang TT, Majumdar SR, Marrie TJ, Eurich DT. Recurrent pneumonia: a review with focus on clinical epidemiology and modifiable risk factors in elderly patients. *Drugs Aging.* 2015 Jan 10;32(1):13–9.
162. Ikeda J, Kojima N, Saeki K, Ishihara M, Takayama M. Perindopril increases the swallowing reflex by inhibiting substance P degradation and tyrosine hydroxylase activation in a rat model of dysphagia. *Eur J Pharmacol.* 2015 Jan 5;746:126–31.
163. Wallace KL, Middleton S, Cook IJ. Development and validation of a self-report symptom inventory to assess the severity of oral-pharyngeal dysphagia. *Gastroenterology.* 2000 Apr;118(4):678–87.
164. Clavé P, Arreola V, Romea M, Medina L, Palomera E, Serra-Prat M. Accuracy of the volume-viscosity swallow test for clinical screening of oropharyngeal dysphagia and aspiration. *Clin Nutr.* 2008 Dec;27(6):806–15.
165. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101–8.
166. Alvarez-Berdugo D, Rofes L, Farré R, Casamitjana JF, Enrique A, Chamizo J, et al. Localization and expression of TRPV1 and TRPA1 in the human oropharynx and larynx. *Neurogastroenterol Motil.* 2016 Jan 4;28(1):91–100.
167. Alvarez-Berdugo D, Jiménez M, Clavé P, Rofes L. Pharmacodynamics of TRPV1 agonists in a bioassay using human PC-3 cells. *Sci World J.* 2014;2014.
168. Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White Iii CL, et al. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol.* 2010 Jun;119(6):689–702.
169. Mu L, Sobotka S, Chen J, Su H, Sanders I, Nyirenda T, et al. Parkinson disease affects peripheral sensory nerves in the pharynx. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2013 Jul;72(7):614–23.
170. Mu L, Sobotka S, Chen J, Su H, Sanders I, Adler CH, et al. Alpha-synuclein pathology and axonal degeneration of the peripheral motor nerves innervating pharyngeal muscles in Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2013 Feb;72(2):119–29.
171. Leow LP, Beckert L, Anderson T, Huckabee ML. Changes in chemosensitivity and mechanosensitivity in aging and Parkinson's disease. *Dysphagia.* 2012 Mar;27(1):106–14.
172. Mu L, Chen J, Sobotka S, Nyirenda T, Benson B, Gupta F, et al. Alpha-Synuclein Pathology in Sensory Nerve Terminals of the Upper Aerodigestive Tract of Parkinson's Disease Patients. *Dysphagia.* 2015;30(4):404–17.
173. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, White LE. *Neuroscience.* 5th Ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc; 2012.
174. Cabib C, Ortega O, Kumru H, Palomeras E, Vilardell N, Alvarez-Berdugo D, et al. Neurorehabilitation strategies for poststroke oropharyngeal dysphagia: from compensation to the recovery of swallowing function. *Ann N Y Acad Sci.* 2016 Jul 11;1–18.
175. Kido M a, Muroya H, Yamaza T, Terada Y, Tanaka T. Vanilloid receptor expression in the rat tongue and palate. *J Dent Res.* 2003;82(5):393–7.

176. Kawashima M, Imura K, Sato I. Topographical organization of TRPV1-immunoreactive epithelium and CGRP-immunoreactive nerve terminals in rodent tongue. *Eur J Histochem*. 2012;56(2):129–34.
177. Hou M, Uddman R, Tajti J, Kanje M, Edvinsson L. Capsaicin receptor immunoreactivity in the human trigeminal ganglion. *Neurosci Lett*. 2002;330(3):223–6.
178. Tachibana T, Chiba H. Relationship between glossodynia and capsaicin sensitive sensory neurons. *J Japanese Stomatol Soc*. 2006;55(3):167–78.
179. Hamamoto T, Takumida M, Hirakawa K, Tatsukawa T, Ishibashi T. Localization of transient receptor potential vanilloid (TRPV) in the human larynx. *Acta Otolaryngol*. 2009;129(5):560–8.
180. Marincsák R, Tóth BI, Czifra G, Márton I, Rédl P, Tar I, et al. Increased expression of TRPV1 in squamous cell carcinoma of the human tongue. *Oral Dis*. 2009 Jul;15(5):328–35.
181. Southall MD, Li T, Gharibova LS, Pei Y, Nicol GD, Travers JB. Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Jan;304(1):217–22.
182. Morgan CR, Bird EV, Robinson PP, Boissonade FM. TRPA1 expression in human lingual nerve neuromas in patients with and without symptoms of dysaesthesia. *Neurosci Lett*. 2009;465(2):189–93.
183. Peyrot des Gachons C, Uchida K, Bryant B, Shima A, Sperry JB, Dankulich-Nagrudny L, et al. Unusual pungency from extra-virgin olive oil is attributable to restricted spatial expression of the receptor of oleocanthal. *J Neurosci*. 2011 Jan 19;31(3):999–1009.
184. Bíró T, Kovács L. An “ice-cold” TR(i)P to skin biology: the role of TRPA1 in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2009;129(9):2096–9.
185. Dhaka A, Earley TJ, Watson J, Patapoutian A. Visualizing cold spots: TRPM8-expressing sensory neurons and their projections. *J Neurosci*. 2008 Jan 16;28(3):566–75.
186. Vandewauw I, Owsianik G, Voets T. Systematic and quantitative mRNA expression analysis of TRP channel genes at the single trigeminal and dorsal root ganglion level in mouse. *BMC Neurosci*. 2013 Feb 14;14(1):21.
187. Sato T, Fujita M, Kano M, Hosokawa H, Kondo T, Suzuki T, et al. The distribution of transient receptor potential melastatin-8 in the rat soft palate, epiglottis, and pharynx. *Cell Mol Neurobiol*. 2013 Mar;33(2):161–5.
188. Deval E, Lingueglia E. Acid-Sensing Ion Channels and nociception in the peripheral and central nervous systems. *Neuropharmacology*. 2015 Jul;94:49–57.
189. Molliver DC, Immke DC, Fierro L, Paré M, Rice FL, McCleskey EW. ASIC3, an acid-sensing ion channel, is expressed in metaboreceptive sensory neurons. *Mol Pain*. 2005 Nov 23;1:35.
190. Liu L, Simon SA. Similarities and differences in the currents activated by capsaicin, piperine, and zingerone in rat trigeminal ganglion cells. *J Neurophysiol*. 1996;76(3):1858–69.
191. Okumura Y, Narukawa M, Iwasaki Y, Ishikawa A, Matsuda H, Yoshikawa M, et al. Activation of TRPV1 and TRPA1 by black pepper components. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010;74(5):1068–72.
192. Ursu D, Knopp K, Beattie RE, Liu B, Sher E. Pungency of TRPV1 agonists is directly correlated with kinetics of receptor activation and lipophilicity. *Eur J Pharmacol*. 2010;641(2–3):114–22.
193. Hayes P, Meadows HJ, Gunthorpe MJ, Harries MH, Duckworth DM, Cairns W, et al. Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain*. 2000;88(2):205–15.

194. Gunthorpe MJ, Rami HK, Jerman JC, Smart D, Gill CH, Soffin EM, et al. Identification and characterisation of SB-366791, a potent and selective vanilloid receptor (VR1/TRPV1) antagonist. *Neuropharmacology*. 2004;46(1):133–49.
195. Teismann IK, Steinstraeter O, Stoeckigt K, Suntrup S, Wollbrink A, Pantev C, et al. Functional oropharyngeal sensory disruption interferes with the cortical control of swallowing. *BMC Neurosci*. 2007;8(1):62.
196. Rofes L, Arreola V, Mukherjee R, Swanson J, Clavé P. The effects of a xanthan gum-based thickener on the swallowing function of patients with dysphagia. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014 May;39(10):1169–79.
197. Vilardell N, Rofes L, Arreola V, Speyer R, Clavé P. A Comparative Study Between Modified Starch and Xanthan Gum Thickeners in Post-Stroke Oropharyngeal Dysphagia. *Dysphagia*. 2016 Apr 25;31(2):169–79.
198. Maccarrone M, Di Rienzo M, Battista N, Gasperi V, Guerrieri P, Rossi A, et al. The endocannabinoid system in human keratinocytes. Evidence that anandamide inhibits epidermal differentiation through CB1 receptor-dependent inhibition of protein kinase C, activation protein-1, and transglutaminase. *J Biol Chem*. 2003 Sep 5;278(36):33896–903.
199. Ahluwalia J, Urban L, Bevan S, Nagy I. Anandamide regulates neuropeptide release from capsaicin-sensitive primary sensory neurons by activating both the cannabinoid 1 receptor and the vanilloid receptor 1 in vitro. *Eur J Neurosci*. 2003;17(12):2611–8.
200. Shin T, Watanabe S, Wada S, Maeyama T. Sensory nerve endings in the mucosa of the epiglottis—morphologic investigations with silver impregnation, immunohistochemistry, and electron microscopy. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1987 Jan;96(1):55–62.
201. Watanabe I, Yamada E. Unusual nerve endings found in the rat palatine mucosa. *Arch Histol Jpn Nippon soshikigaku kiroku*. 1984;47(2):187–96.
202. van Oosterhout WPJ, Schoonman GG, Garrelds IM, Danser AHJ, Chan KY, Terwindt GM, et al. A human capsaicin model to quantitatively assess salivary CGRP secretion. *Cephalalgia*. 2015 Jul;35(8):675–82.
203. Suntrup-Krueger S, Bittner S, Recker S, Meuth SG, Warnecke T, Suttrup I, et al. Electrical pharyngeal stimulation increases substance P level in saliva. *Neurogastroenterol Motil*. 2016 Jun 12;28(6):855–60.



ANEXOS

ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES

Issue: *The Esophagiome*

Oropharyngeal and laryngeal sensory innervation in the pathophysiology of swallowing disorders and sensory stimulation treatments

Daniel Alvarez-Berdugo,^{1,2} Laia Rofes,² J. Francesc Casamitjana,³ Andreína Padrón,⁴ Miquel Quer,⁵ and Pere Clavé^{1,2,6}

¹Gastrointestinal Motility Laboratory, Hospital de Mataró, Consorci Sanitari del Maresme, Mataró, Spain. ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain. ³ENT Department, Hospital de Mataró, Consorci Sanitari del Maresme, Mataró, Spain. ⁴Department of Pathology, Hospital de Mataró, Consorci Sanitari del Maresme, Mataró, Spain. ⁵ENT and Cervicofacial Pathology Department of Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain. ⁶Fundació Institut de Investigació Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

Address for correspondence: Pere Clavé, M.D., Ph.D., Department of Surgery, Gastrointestinal Motility Laboratory, Hospital de Mataró, Universitat Autònoma de Barcelona, Carretera de Cirera s/n 08304, Mataró, Spain. pere.clave@ciberehd.org

Oropharyngeal dysphagia (OD) affects older and neurological patients, causing malnutrition and dehydration and increasing the risk for aspiration pneumonia. There is evidence that sensory deficits in those populations are closely related to swallowing disorders, and several research groups are developing new therapies based on sensory stimulation of this area. More information on the sensory innervation participating in the swallow response is needed to better understand the pathophysiology of OD and to develop new treatments. This review focuses on the sensory innervation of the human oropharynx and larynx in healthy people compared with patients with swallowing disorders in order to unravel the abnormalities that may lead to the loss of sensitivity in patients with OD. We also hypothesize the pathway through which active sensory-enhancement treatments may elicit their therapeutic effect on patients with swallowing dysfunctions. As far as we know, this is the first time a review covers the anatomy, histology, ultrastructure, and molecular biology of the sensory innervation of the swallowing function.

Keywords: afferent pathways; oropharynx; larynx; anatomy; histology; molecular biology

Introduction

Oropharyngeal dysphagia (OD) is a symptom described as difficulty or discomfort while transporting the alimentary bolus from the mouth to the esophagus, classified with the codes ICD-9 (787.2) and ICD-10 (R13) in the latest editions of the International Classification of Diseases (ICD) and Related Health Problems promoted by the World Health Organization. OD is a geriatric syndrome affecting institutionalized (up to 51%) and independently living (23%) older people.^{1–3} OD is also a frequent poststroke complication (over 40% incidence)^{4,5} and is a common condition in patients with neurodegenerative diseases, such as Parkinson disease (PD) (35–82% prevalence) and Alzheimer's disease (19–84% prevalence).^{6,7} The main complications caused by OD are malnutrition and dehydration

due to decreased swallowing efficacy and respiratory infection and aspiration pneumonia due to decreased swallowing safety, which allows bolus penetration into the laryngeal vestibule and, in the most severe cases, tracheobronchial aspiration.^{8,9} OD is mainly treated with compensatory strategies, such as food and liquid bolus adaptation, postures, and swallow maneuvers,^{10,11} and as yet there is no specific pharmacological treatment.

The pathophysiology of OD and alterations in the biomechanics of the swallow response, bolus kinematics, and motor response in older patients and neurological patients have been recently characterized.⁸ Most studies have found that OD is caused by prolonged swallow response and delayed oropharyngeal reconfiguration, leading to unsafe swallowing and aspiration, and also by weak tongue

doi: 10.1111/nyas.13150

Ann. N.Y. Acad. Sci. xxxx (2016) 1–17 © 2016 New York Academy of Sciences.

1

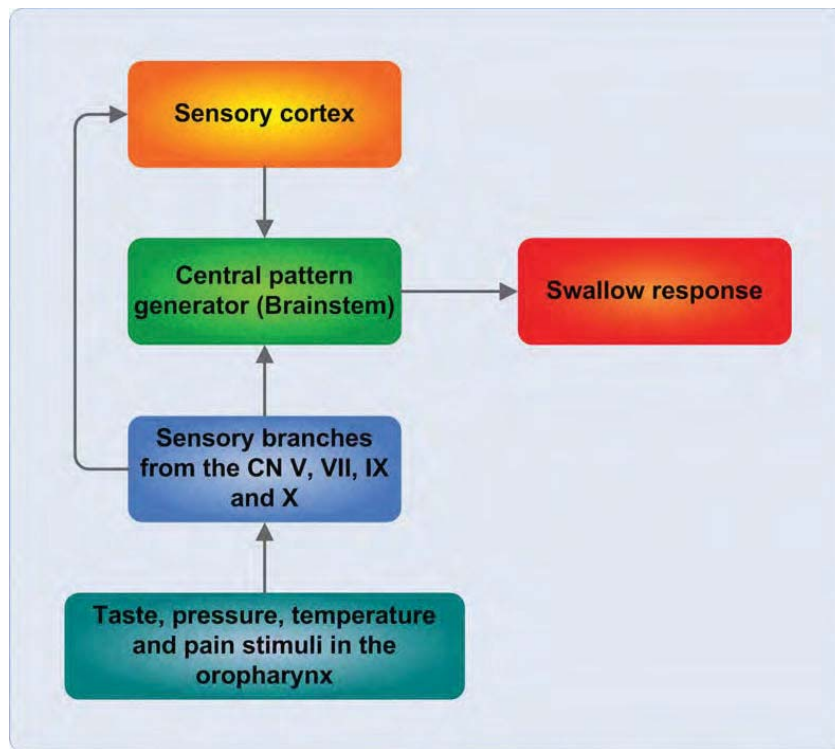


Figure 1. Sensory pathways and swallow response integration. Schematic representation of the neuronal pathways perceiving stimuli in the oropharynx and larynx that lead to the integration of all the information as the swallow response in the central pattern generator in the brain stem.

bolus propulsion, characteristic in patients with oropharyngeal residue.⁸ In addition to these motor impairments, there is evidence linking swallowing impairment with the oropharyngeal sensory deficit of older stroke and PD patients with OD. This sensory deficit has in turn been related to higher prevalence of aspirations,^{12–15} which has led several groups to develop new therapeutic strategies based on enhancing the sensory stimuli on the oropharynx to compensate for the loss of oropharyngeal sensitivity in OD. Treatments include chemical,^{16–22} mechanical,²³ thermal,^{24–26} and electrical stimuli.^{27,28} However, there is no consensus on the oropharyngeal receptors, pathways, and mechanisms by which those treatments improve the swallowing function.

Sensory input from physicochemical properties of the bolus is required during bolus preparation and can trigger and/or modulate the strength and duration of swallow response through complex biofeedback mechanisms.²⁹ Taste, pressure, temperature, and nociceptive and general somatic stimuli from the oropharynx and larynx are transported through cranial nerves V, VII, IX, and X to the

central pattern generator within the nucleus tractus solitarius, where they are integrated and organized with information from the cortex.³⁰ The somatic sensorial input required for proper swallowing is perceived by the lingual branches of the trigeminal (TG) and glossopharyngeal nerves, the pharyngeal branches of the glossopharyngeal and vagus nerves, and the laryngeal branch of the vagus nerve. The swallow response is elicited in the brain stem swallowing center, which receives strong modulating inputs from both the oropharynx and the cortex²⁹ (Fig. 1).

Accurate information on the characteristics of peripheral sensory innervation in health and disease and on the structures involved in the response to sensorial enhancement treatments is needed to develop these new active strategies to treat patients with OD. The aim of this review is to collect and analyze the evidence on the sensory innervation of the human oropharynx and larynx in healthy persons versus patients with swallowing disorder in order to describe the alterations that may cause the loss of sensitivity in the oropharynx and contribute to OD. This review will also allow us to make a hypothesis

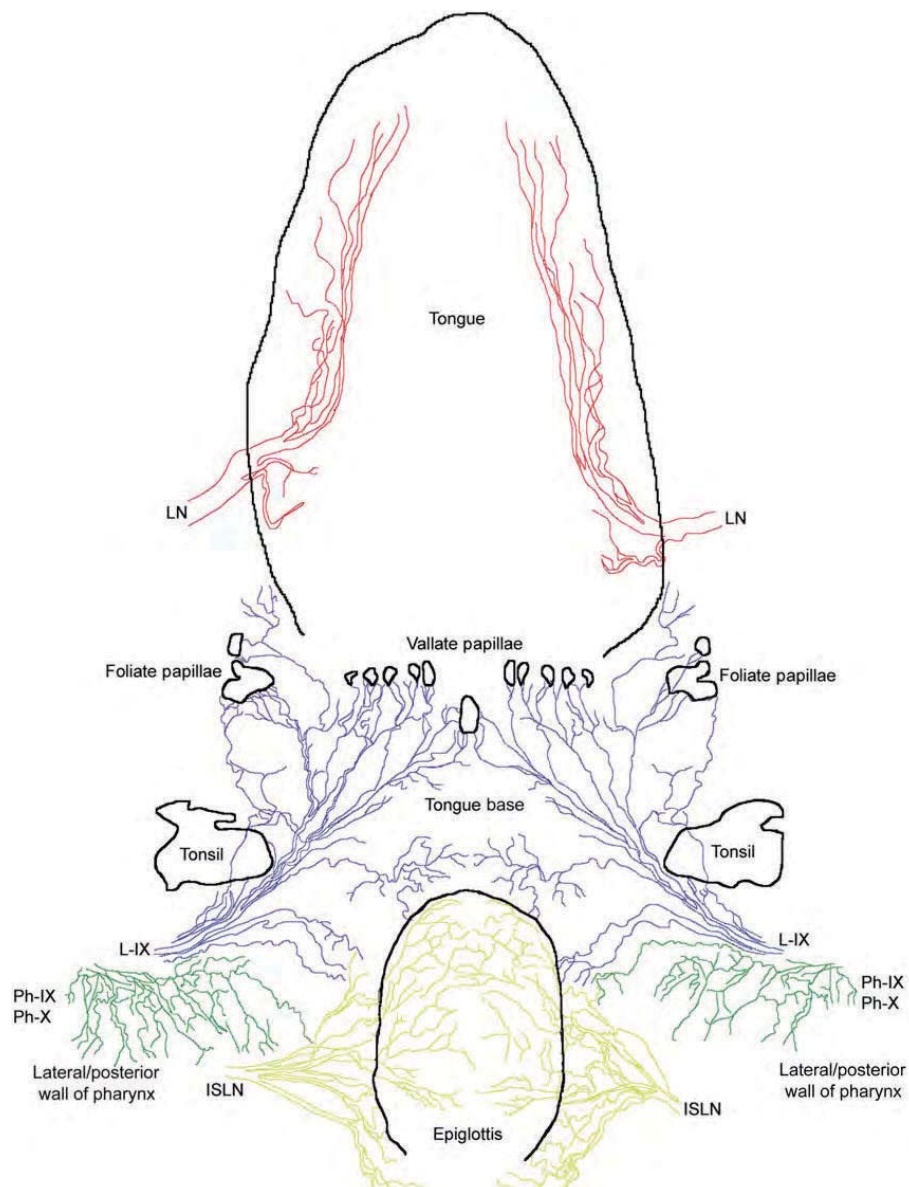


Figure 2. Distribution of the oropharyngeal sensory innervation. Schematic representation of the distribution of the sensory branches of CN V, VII, IX, and X innervating the oropharyngeal mucosa. Based on the Sihler's stain images from Refs. 31–33 and 35.

about the identity of the pathway through which active sensory enhancement treatments elicit their therapeutic effects on patients with swallowing disorders. This information is critically needed to promote the development of dysphagia treatment from compensation to the recovery of the swallowing function.

Sensory innervation of the oral cavity and pharynx

The sensory innervation of the human oral cavity and pharynx occurs via the laryngeal branch of the

vagus nerve (CN X), the pharyngeal branches of the glossopharyngeal (CN IX) and vagus nerves, lingual branches of the TG (CN V) and glossopharyngeal nerves, and some fibers from the chorda tympani from the facial nerve (CN VII; Fig. 2).

The sensorial innervation of the tongue occurs via the lingual branches of the TG, facial, and glossopharyngeal nerves (Fig. 2). Two of the major subdivisions of the L-IX innervate the mucosa of the posterior third of the tongue and its papillae. The L-IX subdivision that supplies the mucosa splits into tertiary branches and twigs that run

toward the midline of the tongue, where they merge with the ones coming from the opposite side. The L-IX subdivision that supplies the papillae splits into lateral and medial branches; the lateral branches innervate the foliate papillae and the lateral circumvallate papillae; while the medial branches innervate ipsilaterally, most circumvallate papillae. The central circumvallate papillae are innervated by the L-IX branches from both sides.³¹ The lingual nerve (LN), comprising the lingual branch of the TG nerve (V) and some fibers from the corda timpani (facial nerve, VII) penetrates the tongue anterior to the circumvallate papillae and innervates the mucosa of the anterior and middle thirds of the tongue. The LN subdivides into lateral and medial branches; the medial branches innervate the ventrolateral tongue mucosa, while the lateral branches innervate the lateral part of the tongue to its anterior tip. Both lateral and middle branches form anastomosis with the hypoglossal nerve (XII) running medial to the tongue.³² The LN also forms an anastomosis with the L-IX fibers at the edge of the posterior third of the tongue.³³

Oropharyngeal sensorial innervation occurs via the pharyngeal and lingual branches of the glossopharyngeal nerve (IX) and the pharyngeal branch of the vagus nerve (X; Fig. 2). The pharyngeal branch of the glossopharyngeal nerve (Ph-IX) splits into three main subdivisions, the superior and middle ones being the main sensory branches of Ph-IX that, together with the sensory division of the pharyngeal branch of the vagus nerve (Ph-X), innervate the lateral and posterior walls of the pharynx. These two groups of terminal nerve branches form a dense plexus in the mucosa of this region.³¹ The lingual branch of the glossopharyngeal nerve (L-IX) subdivides into four main branches, two of which provide sensory innervation to the tonsils and peritonsillar areas and the lingual surface of the epiglottis. The L-IX subdivision that supplies the tonsils and peritonsillar area splits into two or three tertiary branches that surround the tonsils. The subdivision that supplies the epiglottis also splits into two or three tertiary sensorial branches; one of them innervates the lingual surface of the epiglottis and the others form an anastomosis with the superior branch of the internal superior laryngeal nerve (ISLN).³¹

The hypopharyngeal sensorial innervation occurs via the laryngeal branches of the vagus nerve. The ISLN penetrates the thyrohyoid membrane and sub-

divides into three branches.³⁴ According to Sanders and Mu, using Sihler's stain, the superior branch innervates the laryngeal surface of the epiglottis,³⁵ but Olthoff *et al.* later demonstrated by cadaver dissection that, in fact, the superior branch of the ISLN is found in the lingual surface of the epiglottis and penetrates it through foramina;³⁶ either way, the superior branch of the ISLN penetrates the epiglottis from both sides through the aryepiglottic fold and subdivides into twigs that form a dense network and merge with the ones coming from the opposite side.^{34,35} The middle branch of the ISLN supplies the aryepiglottic fold, the laryngeal vestibule, and the vocal folds; it trespasses the thyrohyoid membrane as well and subdivides into secondary and tertiary branches. It then innervates the mucosa with a network of interconnected twigs.^{34,35} The inferior branch is the one with the largest diameter and its distribution is the most complex: it innervates the arytenoid cartilage with its superior subdivisions, the posterior surface of the arytenoid region and the interarytenoid muscle with its middle subdivisions, and the mucosa of the anterior wall of the hypopharynx with its inferior subdivisions.^{34,35}

In previous studies, topical anesthesia on oropharyngeal innervation reduced activation of the primary motor cortex and impaired control of the muscles involved in deglutition in healthy volunteers.³⁷ Moreover, experiments on animals in which the ISLN was sectioned caused swallowing dysfunction³⁸ and weakened the thyroarytenoid muscle.³⁹ All of these facts correlate with the anatomical and functional connections between afferent and efferent pathways, both at the periphery⁴⁰ and the central nervous system,³⁷ and suggest a strong relationship between decreased oropharyngeal sensitivity and impaired swallowing motor response.

Histology of the oropharyngeal mucosa and its innervation

The structures in the oral cavity, the oropharynx, and the hypopharynx are covered, according to their function, by three types of mucosa, while the structures of the larynx, including the laryngeal surface of the epiglottis, are covered by respiratory mucosa. The mucosa covering structures supporting higher shear force, such as the gingival mucosa or the hard palate mucosa, is called *masticatory mucosa*. The mucosa covering most other structures, except

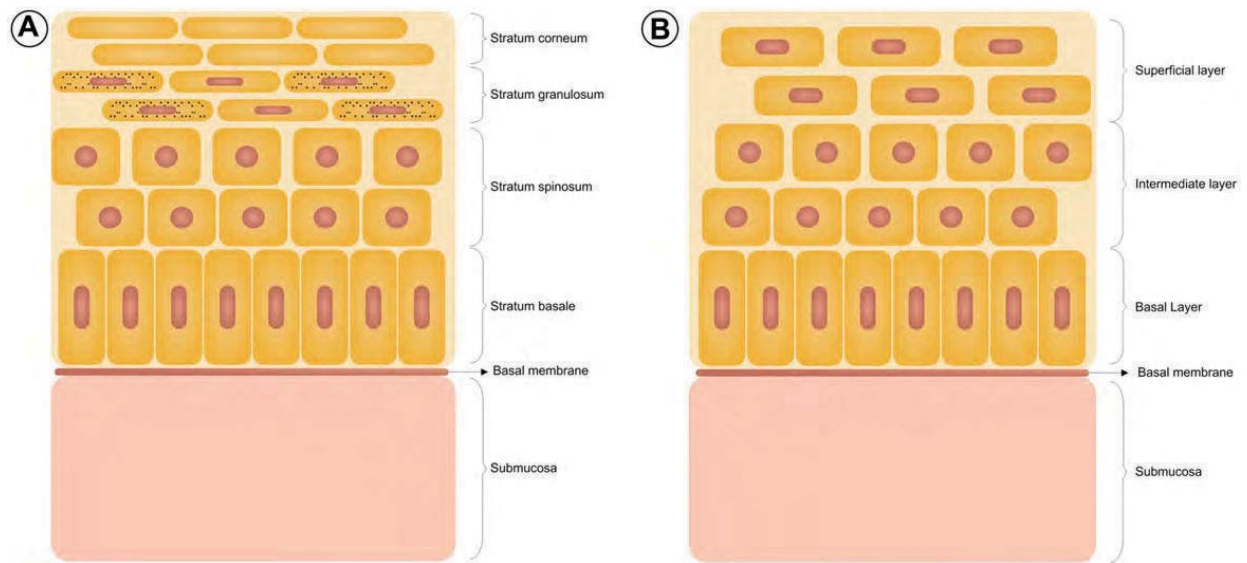


Figure 3. Structure of the oropharyngeal mucosa. Schematic representation of the two kinds of epithelium covering oropharyngeal cavities. (A) Keratinized epithelium: from bottom to top, there is the basal lamina, the stratum basale, the stratum spinosum, the stratum granulosum, and the stratum corneum. (B) Nonkeratinized epithelium: from bottom to top, there is the basal layer, the intermediate layer, and the superficial layer.

for the dorsal tongue and the soft palate, is named *lining mucosa*. The specialized mucosa covering the dorsal tongue and soft palate contains filiform papillae, covered by keratinized epithelia, and fungiform, foliate, and circumvallate papillae, covered by nonkeratinized epithelia (Fig. 3). These nonkeratinized structures are specialized in perceiving taste sensation through the taste buds located in the ridges around the circumvallate papillae and on the fungiform and foliate papillae. The biggest nerve fibers and vascular vessels are found in the deeper layers of the connective tissue. The smaller ones supply the most superficial layers, originating capillary loops and nerve filaments that innervate the papillary elements of the mucosa, reaching the basal lamina and trespassing it in some cases^{41,42} (Fig. S1).

The taste buds, the taste-sensing elements that can distinguish between the five basic tastes (salt, sweet, bitter, sour, and umami), are located on the fungiform papillae of the soft palate and the dorsal surface of the anterior two-thirds of the tongue and on the circumvallate and foliate papillae of the posterior third of the tongue. Taste buds on fungiform papillae are innervated by the facial nerve fibers (VII) contained in the LN. Taste buds on the circumvallate and foliate papillae are innervated by the L-IX nerve fibers. Taste buds are onion-like structures

formed by specialized epithelial cells;^{43,44} these cells were initially classified as types I, II, and III according to their morphology,⁴⁵ but specific functionality was later identified for each of these cell types. Type I cells are the most abundant (50–75% of taste bud cells), play a role as support cells,⁴⁶ and seem to be implicated in salt taste transduction.⁴⁷ Type II cells are implicated in the umami, sweet, and bitter taste transduction, depending on the specialized receptor they express.^{48,49} Type III cells present synaptic junctions with the nerve terminal⁵⁰ and are implicated in sour and salt taste transduction.⁴⁹ Taste cells are all connected, so that type I cells support the sensing and synaptic functions of types II and III cells; type II cells are the ones that finely perceive tastes and transmit the signal to type III cells, which finally send the stimuli information to the nerve terminal.⁴⁶ The nerve terminal, independent of the nerve branch it comes from, penetrates the basal lamina and emits processes that surround type III cells, thus forming a synapse^{50,51} (Fig. 4).

Mechanical, thermal, and noxious stimuli are perceived in the oral cavity and oropharynx by the corresponding branches of the CN V, IX, and X nerves through specialized sensory structures mainly located in the submucosa (Fig. 4). Lamellar corpuscles and Merkel cells perceive mechanical stimuli, and free nerve endings and Krause

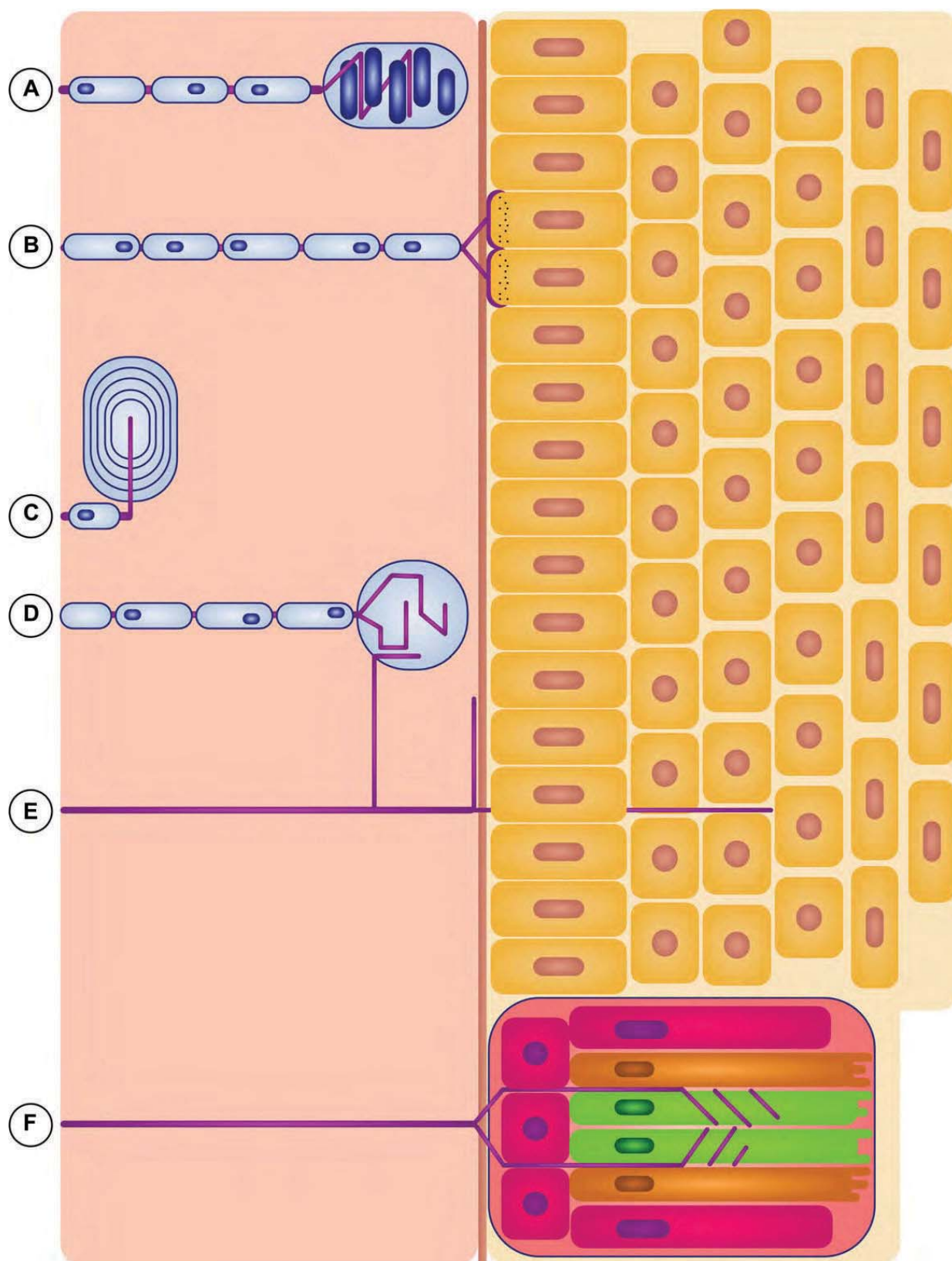


Figure 4. Specialized sensory structures found in the mucosa. Schematic representation of the specialized sensory structures perceiving mechanical, thermal, and chemical stimuli in the oropharyngeal mucosa. (A) Meissner corpuscles. (B) Merkel cells. (C) Pacini corpuscle. (D) Krause bulb. (E) Free nerve ending. (F) Taste bud.

corpuses perceive thermal and noxious stimuli. Lamellar corpuses can be found in the most superficial layer of the subepithelial connective tissue. The intensity of the stimuli they perceive depends on their morphology and precise location. Meissner corpuses are located in groups inside the papillary space disposed in different directions,⁵² are supplied by one to three myelinated nerve fibers that may form branches inside the corpuscle and are covered by a connective tissue capsule that separates it from the basal lamina of the epithelium,^{52,53} and perceive light touch without pain. Pacini corpuses are located deep inside the subepithelial connective tissue, are supplied by a single myelinated nerve fiber that runs straight inside the corpuscle,^{54,55} and perceive deep touch without pain. Merkel cells are located either alone or grouped in the basal layer of the epithelium and have granules at the bottom where they contact myelinated nerve fibers;^{56,57} Merkel cells perceive the lightest touch without pain. Krause bulbs, also known as bulboid corpuses, are located in the lamina propria in the papillary space and, like Meissner corpuses, they are supplied by one to three nerve fibers and are covered by a capsule, but the nerve fibers supplying Krause bulbs are both myelinated and nonmyelinated;^{58,59} Krause bulbs perceive light touch and cold stimuli. Finally, there is no agreement on the location of free nerve endings: most authors have described close contact between the free nerve endings below the basal lamina and the epithelial cells of the basal layer of the epithelium,⁵⁷ and some have also stated that free nerve endings penetrate the epithelium and reach more superficial layers.⁶⁰ In any case, intraepithelial fibers have been described as scarce in the oropharynx; free nerve endings perceive pain and chemical and thermal stimuli (Fig. 4).

Some studies have found histological alterations in peripheral sensory nerves of the oropharynx in patients at high risk for swallowing disorders. For instance, α -synuclein disorders have been found in the nerves innervating the oropharynx in patients with neurodegenerative diseases, such as PD, Alzheimer's disease, or dementia with Lewy bodies.⁶¹ α -synuclein disorders have been related to dysphagia in PD patients with damage in either the sensory or motor oropharyngeal peripheral nerves^{62,63} and are among the leading causes of the decreased oropharyngeal sensitivity and the higher risk of aspiration found in PD patients and those

with other neurodegenerative diseases resulting from damage in the central nervous system.^{14,15,62,64}

Ultrastructure of the specialized sensory structures

Meissner corpuses are supplied by one to three axon terminals that lose their myelin sheaths before entering the corpuscle, forming branches^{53,65} or presenting a discoid shape.⁶⁶ The axon terminal is surrounded by several layers of cytoplasmic lamellae, with lamellae interspaces occupied by collagen fibers and a collagen capsule that contacts the basal lamina. Desmosome-like junctions are present between lamellae and between the inner lamellae and the axon terminal. The axon is filled with mitochondria, microtubules, and vesicles.^{52,53,65,66} The interspaces between the axon terminal and the inner cytoplasmic lamellae are not filled with collagen fibers, but the axon terminal presents projections that trespass the first line of lamellae and reach the collagen fibers in the interlamellae space; these projections are characterized by containing many vesicles^{52,66} (Fig. S2A).

Krause corpuses or corpuscular nerve endings are supplied by one to three nerve terminals; unlike Meissner corpuses, these terminals can be myelinated or nonmyelinated, and, if both types run into the same corpuscle, they do not make contact.⁵⁸ Myelinated fibers lose the myelin sheath just before entering the corpuscle, run in coils inside the corpuscle, and divide into several axon terminals that end in varicosities full of vesicles, neurofilaments, microtubules, and mitochondria. These nerve endings present axolemas that make close contact with the cytoplasmic lamellae and the intercellular substance.^{58,59} The cytoplasmic lamellae covering all nerve fibers are derived from Schwann cells⁵⁹ containing microfilaments, vesicles, and sparse mitochondria. The junctions between axon terminals and lamellae are desmosome-like. Covering the corpuscle, there is a capsule formed by a single layer of a few fibroblast cells and many collagen fibers^{58,59} (Fig. S2B).

Merkel cells are supplied by axon terminals that penetrate the basal lamina after losing their myelin sheaths;^{56,67,68} each Merkel cell has its basal portion covered by a meniscoid nerve terminal.⁶⁷ The nerve terminal is packed with mitochondria and does not go further up into the epithelium; although some authors describe a membrane thickening,⁶⁸

generally no junction has been observed between the Merkel cell and the nerve terminal.^{56,67} Merkel cells present protrusions in their apical portion that penetrate the invaginations of neighboring epithelial cells. Their nuclei are lobulated, and they present many electron-dense granules in their basal portion; Merkel cells present a few underdeveloped desmosome-like junctions with neighboring epithelial cells and are always in contact with the basal lamina^{56,67,68} (Fig. S2D).

Free nerve endings divide into branches and form varicosities beneath the basal lamina; those varicosities are partially covered by Schwann cells that are in close contact with the basal lamina. Desmosome-like junctions are present between the nerve varicosity and the Schwann cell membranes. In some places, both the Schwann cell and the basal lamina become thinner, and axonal processes trespass them and reach the stratum basale of the epithelium. While the varicosities are packed with mitochondria, the axonal processes trespassing the basal lamina are packed with vesicles, and no membrane junction is observed between the axonal process and the epithelial cells around it.^{69–71} Free nerve endings can be distributed as clusters of nerve fibers beneath the basal layer forming glomerular corpuscular endings that culminate in the varicosities described above⁷⁰ (Fig. S2C).

In gingival epithelium, free nerve endings go past the stratum basale and axon terminals penetrate the stratum spinosum, sheathed by epithelial cells, which gives them the appearance of intracytoplasmic fibers when examined with light microscopes; the junctions between two epithelial cells sheathing the neurite resembles that of a Ranvier's node.⁷² Similar observations have been made in the epidermis. These axon terminals present mitochondria within the epidermis.⁶⁰ In either case, the fibers are scarce and present no junction structures with adjacent epithelial cells.

No studies have demonstrated that ultrastructure changes in nerves are related to oropharyngeal dysphagia or decreased oropharyngeal sensory innervation.

Receptors for chemosensation and thermosensation

Specialized sensory structures of the TG (V), glossopharyngeal (IX), and vagus (X) nerves can be activated by physical stimuli (mechanical forces and

temperature) and by a huge array of chemical agents that evoke sensory responses with broad perceptual qualities.⁷³ Chemosensation and thermosensation in these sensory nerves is achieved mainly through a family of specialized multimodal ion channels called transient receptor potential (TRP) channels that open under certain conditions, generating a cellular calcium influx. Most of these channels respond to more than one kind of stimulus, some of them being sensitive to temperature, pH, and several irritant substances at the same time. As previously stated, the perception of all these stimuli is required during bolus preparation to trigger and/or modulate the strength and duration of the swallow response.²⁹ These channels are mainly expressed in neural ganglia and found in free nerve ending terminals, but can also be expressed in nonneuronal cells, such as epithelial cells.⁷⁴

TRP cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) was the first multimodal transducer identified, in 1997, by Caterina *et al.*⁷⁵ TRPV1 is activated by several stimuli, such as noxious heat temperatures (>43 °C), extracellular protons, some endogenous molecules released during tissue damage and inflammatory processes, and exogenous irritant and pungent compounds, such as capsaicin, the main component of red pepper (*Capsicum* spp.; Table 1). TRPV1 was initially thought to be expressed only in sensory neurons from TG and dorsal root ganglia, but now it is clear that TRPV1 is expressed in many other cellular types and tissues (reviewed in Ref. 76). Of particular interest is the finding that TRPV1 is coexpressed in keratinocytes with proinflammatory factors (interleukin (IL) 8, prostaglandin E₂) that are released upon activation of TRPV1, which suggests that keratinocytes might amplify noxious stimuli with the release of these inflammatory mediators, which may act on free nerve endings, enhancing the neurogenic inflammation and nociceptive signaling.⁷⁷ In the oral cavity and oropharynx, TRPV1 has been detected at both the mRNA and protein levels in the tongue mucosa in nerve terminals and epithelial cells;^{78–80} immunoreactivity to TRPV1 has also been found in nerve fibers innervating the human larynx.^{81,82} A recent study also found TRPV1 expression in the mucosa of the human tongue, pharynx, and epiglottis and TRPV1 immunoreactivity on the membranes of epithelial cells of these regions, as well as on nerve fibers and leukocytes⁸³ (Fig. S3). In experiments using animal

Table 1. Natural agonists and physical activators of TRPV1, TRPA1, and TRPM8

TRPV1	TRPA1	TRPM8
Temperature (≥ 43 °C)	Temperature (≤ 17 °C)	Temperature (≤ 25 °C)
Acidic pH	1,4-Dihydropyridines	Eucalyptol (eucalyptus)
2-APB	Allicin (garlic)	Geraniol (geranium, lemon)
Allicin (garlic)	Allyl isothiocyanate (mustard)	Icilin
Anandamide	Bradykinin	Linalool (tejpat)
Camphor (camphor laurel)	Cannabichromene (cannabis)	Menthol (peppermint)
Cannabidiol (cannabis)	Cannabidiol (cannabis)	
Cannabigerol (cannabis)	Cannabinol (cannabis)	
Capsaicin (chili peppers)	Capsiate (chili peppers)	
Eugenol (cloves)	Cinnamaldehyde (cinnamon)	
Gingerol (ginger)	Curcumin (turmeric)	
Hydrogen sulfide	Eugenol (cloves)	
Nitric oxide	Gingerol (ginger)	
Piperine (black pepper)	Hydrogen sulfide	
Polygodial (Dorrigio pepper)	Icilin	
	Nitric oxide	
	Tetrahydrocannabinol (cannabis)	

Note: Natural source in parentheses.

tissue, TRPV1 has been located in nerves supplying rat pharynx, epiglottis, and soft palate.⁸⁴

After TRPV1 characterization, many other TRP receptors have been identified; among them, TRPM8 and TRPA1 (formerly ANKTM1) are the main candidates to perceive cold stimuli (15–30 °C and <18 °C, respectively).^{85–87} There is still controversy around which of them is the noxious cold receptor; *in vitro*, the fact that TRPA1 coexpresses with inflammatory mediators (substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP)) makes it the best candidate,^{86,88} but *in vivo* experiments seem to suggest otherwise.^{89–91}

TRPM8 and TRPA1 are also activated by cooling compounds, such as menthol: low concentrations of menthol activate TRPA1, while high concentrations of menthol block TRPA1 and activate TRPM8.⁸⁸ TRPA1 is also activated by many other natural and synthetic irritants, such as allyl isothiocyanate (in mustard oil), cinnamaldehyde (in cinnamon oil), allicin and diallyl disulfide (in garlic extract), methyl salicylate (in wintergreen oil), ginger, and carvacrol (in oregano)⁹² (Table 1).

Animal studies have revealed that TRPM8 is expressed in a subpopulation (10–15%) of small-diameter, cold-sensitive peripheral sensory neurons,⁸⁵ while TRPA1 is coexpressed in a TRPV1–CGRP subpopulation.⁸⁶ TRPA1 is exclusively

expressed in C-fibers, while TRPM8 is expressed both in A δ - and C-fibers.⁹³ To date, there is no experimental evidence of the localization of TRPM8 in the human oropharynx, but, in animal experiments, TRPM8 has been located in rat fungiform, foliate, and circumvallate papillae supplying fibers from the TG and glossopharyngeal nerves,⁹⁴ as well as in the epithelial cells, taste buds, and the nerve fibers supplying the rat soft palate, epiglottis, and pharynx.⁹⁵ TRPA1, however, has been located in nerve fibers supplying the human pharyngeal fungiform papillae epithelium,⁹⁶ and other studies have found TRPA1 localization in keratinocytes.^{97,98} A recent study from our group found TRPA1 expression in the mucosa of the human oropharynx and oral cavity and TRPA1 immunoreactivity on subepithelial elements, such as nerve fibers and fibroblasts, in these areas⁸³ (Fig. S3). TRPA1 has also been located in rat TG and dorsal root ganglia and in odontoblasts.^{86,98}

Besides TRPV1, TRPA1, and TRPM8, there are other TRP channels involved in sensory stimuli perception. For instance, TRPV2 responds to noxious thermal stimuli (>52 °C),⁹⁹ TRPV3 responds to temperature changes in the range of physiological temperatures (between 22 and 40 °C),¹⁰⁰ and TRPV4 responds to osmotic and mechanical noxious stimuli.^{101,102} TRPV2 has been located

on nerves innervating the rat pharynx, soft palate, epiglottis, and larynx mucosa.⁸⁴ TRPV3 expression has been found in mouse and rat keratinocytes and neurons.^{103–105} TRPV4 expression has been found in human trachea and salivary glands.¹⁰⁶ Beyond the TRPV family, TRPC1 and TRPC6 are also involved in mechanical noxious stimuli perception in coordination with TRPV4.¹⁰²

No studies have related changes in the expression or localization of TRP family channels to increased risk of OD or decreased oropharyngeal sensitivity. In contrast, patients with nonerosive reflux disease and erosive esophagitis with heartburn present increased expression of TRPV1 at both the mRNA and protein levels in the esophagus, which is directly related to a higher perception of burning pain and the release of proinflammatory factors in the esophagus.¹⁰⁷ Thus, while higher expression of TRPV1 is related to increased sensitivity, it can be hypothesized that lower expression of TRPV1 might be closely related to reduced oropharyngeal sensitivity.

Discussion

Following the results obtained from this review, we believe that knowledge on the sensory innervation and the receptors expressed in the human oropharynx and larynx is limited, and we need further research to better understand the pathophysiology of OD and to develop new active therapeutic strategies for patients with swallowing disorders. Our review further supports the relevant role of impaired oropharyngeal sensitivity in the pathophysiology of oropharyngeal dysphagia and the principles for dysphagia treatments based on oropharyngeal sensory stimulation as promising therapeutic strategies for patients with swallowing disorders.³⁰

Despite the anatomical complexity of the oropharyngeal afferent innervation, there is wide consensus that sensory input is collected by CN V, VII, IX, and X in this area. These afferent nerves innervate the oropharyngeal mucosa with dense networks, and their distribution throughout the oropharynx is well known from an anatomical perspective. This dense distribution of oropharyngeal innervation accounts for the fine perception required for proper coordination of the swallowing response. Among those nerves, Ph-IX and ISLN are the main ones related to the swallow response, and several animal studies have explored which one is more relevant for eliciting it.^{38,108–112} In these studies, surgical damage

of Ph-IX caused abolition of swallow response,¹⁰⁸ while surgical damage of ISLN was related to higher effort requirement to elicit swallow response but not abolition.¹⁰⁹ Those studies also pointed out that swallowing response was more effectively elicited by stimulation of the posterior edge of the soft palate, the palatopharyngeal arch, and the posterior pharyngeal wall, mainly innervated by Ph-IX.¹⁰⁸ Other studies using electrical stimulation have shown that both Ph-IX and ISLN have to be stimulated to elicit swallow response,^{110,111} which suggests coordinated stimuli perception through both nerves to elicit swallow response.

Oropharyngeal mucosa perceives a wide range of sensations through specialized structures and receptors located below or within. Mechanical stimuli are perceived through specialized structures below the epithelium, while chemical and thermal stimuli are perceived either through taste buds for flavors or through sensory receptors on free nerve endings for other chemical compounds and thermal stimuli. All of these structures and receptors perceive bolus position and other sensory stimuli important for the activation of the swallowing response and the experience of eating and drinking (Table 1). Many groups have tried to use those stimuli to improve deglutition in patients with swallowing diseases. For instance, the use of flavor has been proved to affect swallowing response in neurogenic and head and neck cancer patients with OD.^{16,113} Salty flavor prolonged swallowing, while sweet flavor shortened swallow response with a short-term effect.¹¹³ The flavor with the greatest effect in both studies was sour, with a consistent shortening of swallow response. However, sour flavor can also be perceived by nociceptive receptors¹¹⁴ and thus affect swallowing response through the same pathways as temperature. Chemoreceptors expressed in the oro- and hypopharynx and the mechanical sensing structures within the oropharyngeal mucosa have also been used to increase sensory input in patients with reduced sensibility, such as older, stroke and neurodegenerative disease patients, or can be used to block hypersensitivity causing chronic cough.¹¹⁵ Several studies have obtained promising results using chemical substances to increase sensory input to improve the swallowing response in older and stroke patients,^{17–19,21,116} and mechanical stimuli provided with air pulses have also proved to be effective in improving swallow response in stroke

patients²³ (Table S1). Some of these studies have even enhanced neural plasticity with long-term chemical treatment¹⁷ without known issues related to the sensitization of the oropharynx.^{17,18}

However, there is still controversy over the reach of free nerve endings in the oropharyngeal mucosa and the way that thermal and chemical stimuli elicit responses on these afferent nerves. It is known that free nerve endings penetrate the epithelium in the skin,¹¹⁷ but there is little evidence about their presence within the oropharyngeal epithelium. The evidence collected in our review and many of our experiments on human tissue⁸³ indicate a dense submucosal innervation in contrast to scarce cases of intraepithelial fibers (Fig. S1). On the other hand, some chemoreceptors, such as TRPV1 and TRPA1, are coexpressed in neurons with CGRP and SP,^{79,86} inflammatory mediators that are released upon activation of these channels, promoting the release of proinflammatory cytokines and thus enhancing the sensitization of the area.^{118,119} It is known that SP is a neuropeptide that enhances the swallow and cough reflex and probably acts as a neurotransmitter in the pharyngeal mucosa in response to local stimuli.^{120,121} Sputum levels of SP were reduced in elderly patients with aspiration pneumonia,¹²² and aspiration after stroke may also be related to low SP concentration.¹²³

All of this information leads to the following hypothesis of how chemical stimuli elicit sensory perception: chemical stimulants capable of trespassing the epithelial barrier elicit their effect either directly on subepithelial or intraepithelial nerves or through release of a second messenger, such as anandamide, produced by responsive epithelial cells;¹²⁴ chemical stimulants unable to permeate through epithelia elicit their effects either through second messengers^{77,125} or directly on intraepithelial nerves. Thus, epithelial cells could work as amplifiers of chemical stimuli. The direct contact between epithelial cells and nerves seen on electron microscopes^{69–71} supports the idea of second messengers produced by epithelial cells while not denying the direct activation of nerve receptors by chemical substances reaching deep epithelial layers. Once excited, the sensory nerves release proinflammatory factors that sensitize the area and promote swallow and cough reflex if needed (Fig. 5).

This hypothesis could explain reduced pharyngeal sensitivity and OD in patients with mucosal

damage, such as mucositis caused by chemoradiotherapy, as the loss of epithelial cells would hamper the release of second messengers and the edema and fibrosis associated with the inflammatory response would impair the submucosal fibers.

As previously stated, decreased oropharyngeal sensitivity has been related to unsafe swallowing in older, stroke, and PD patients.^{12–15} Furthermore, besides the direct relationship between decreased oropharyngeal sensitivity and aspiration,¹²⁶ reduced oropharyngeal afferent input to the cortex has been shown to lead to a lack of cortical modulation of the swallowing motor response, which increases the risk of unsafe deglutition.¹²⁷ Laryngeal and hypopharyngeal sensory innervation play an important role in airway protection. Delay in laryngeal vestibule closure due to reduced sensitivity is closely related to aspirations and penetrations to the airway in older, stroke, and PD patients,^{8,12–15} and these are well-known risk factors for the development of aspiration pneumonia.⁹

A thorough knowledge of the oropharyngeal and hypopharyngeal innervation would lead to greater understanding of the pathophysiology of several diseases affecting these regions and establish the basis for new therapeutic strategies, to move from the compensation of those disorders to effective treatments. For instance, intrapharyngeal and transcatheter electrical sensory stimulation have proven effective in the treatment of oropharyngeal dysphagia in stroke patients.^{27,30} A better understanding of the sensory perception pathways would also help develop new treatments based on the sensory enhancement strategies already tested in previous studies.^{16–22} That is why this review ends up with a hypothesis for chemical stimuli perception in the oropharynx; its main aim is to pave the way for future pharmacological treatments for dysphagia patients. However, this review does not explore the mechanical stimuli perception that is also relevant for the normal physiology of swallow response or the role TRP channels play in mechanical transduction (reviewed in Ref. 128). The contribution of TRP channels to mechanical transduction and the molecular pathways underlying the different modalities of mechanosensation are important topics that require further research and a specific review.

This review highlights the need for further research in three of the matters examined: whether free nerve endings reach intermediate or superficial

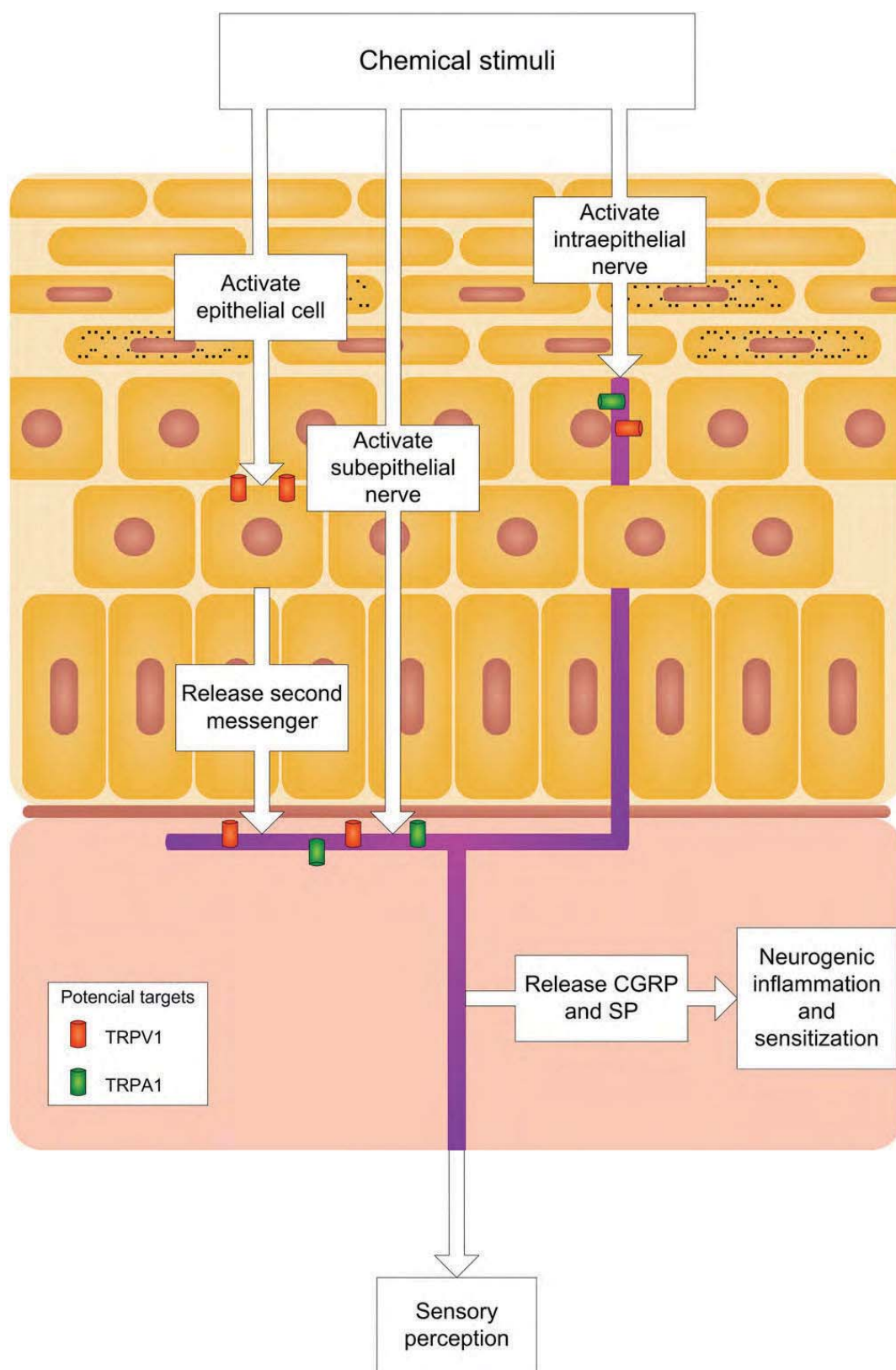


Figure 5. Hypothesis for chemical and thermal stimulation of the oropharyngeal mucosa. Schematic representation of the hypothetical mechanisms through which stimuli are perceived through free nerve endings in the oropharyngeal mucosa.

layers of the epithelium in the oropharyngeal mucosa, how TRP channels are expressed and localized in healthy human oropharynx, and what changes can be found at the sensory innervation level in OD patients and whether there are changes in the expression and localization of TRP channels in those patients.

Oropharyngeal peripheral innervation is a topic that involves anatomical, histological, and molecular disciplines and provides information to understand both taste and swallowing functions. A great understanding of the oropharyngeal swallowing innervation could help develop novel strategies to treat swallowing disorders.

Acknowledgments

This study was supported by grants from Fundació “La Marató” de TV3 (11/2310); the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III (14/00453); the Fundació de Recerca en Gastroenterologia; and the Fundació Salut del Consorci Sanitari del Maresme. CIBEREHD is supported by Instituto de Salud Carlos III.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Figure S1. Histological 100× micrographs of the human oropharyngeal mucosa. (A) Hematoxylin-eosin (H&E) stain of a lingual filiform papilla covered by parakeratinized epithelium. (B) Neuron-specific enolase (NSE) immunohistochemistry (IHC) of a lingual filiform papilla filled with several submucosal nerve fibers and one intraepithelial nerve fiber (arrow). (C) H&E stain of pharyngeal posterior wall mucosa covered by nonkeratinized epithelium. (D) NSE IHC of pharyngeal posterior wall mucosa showing nerve fibers below the basal lamina (arrow heads) and nerve fibers innervating a submucosal gland (asterisks). (E) H&E stain of the lingual surface of the epiglottis mucosa covered by nonkeratinized epithelium. (F) NSE IHC of the lingual surface of the epiglottis mucosa showing thick nerve fibers running deep below the basal lamina (arrowheads).

Figure S2. Electron micrographs of (A) Meissner corpuscles in monkey fungiform papillae 3000×⁶⁶ (EP, epithelial cells; AT, axon terminal in the corpuscle); (B) Krause bulb in human oral mucosa

10,000×⁵⁸ (CI, cells of the inner core; CL, cytoplasmic lamellae; N, nerve fibers; NE, nerve endings; CB, collagen “belts”; CF, collagen fibers); (C) free nerve ending in contact with the basal lamina in human epiglottis mucosa 15000×⁷⁰ (P, nerve process; B, epithelial cells of the basal layer); and (D) Merkel cells in human gingival mucosa 3250×⁵⁶ (#1–4 = Merkel cells; hollow arrow = part of the Merkel cell #2; thin full arrows = basal lamina close to the separated part of Merkel cell #2; asterisk = spine from Merkel cell #2; N = lobulated nucleus of Merkel cell #3; solid thick arrow = contact between Merkel cell #4 and basal lamina).

Figure S3. TRPV1 and TRPA1 fluorescent IHC 400× micrographs of human oropharyngeal mucosa. TRPV1 immunoreactivity (A, C, E) in red is localized on epithelial cells of tongue (A), pharynx (C), and epiglottis (E), while TRPA1 immunoreactivity (B, D, F) in red is localized on subepithelial elements of tongue (B), pharynx (D), and epiglottis (F).

Table S1. Stimulation strategies to treat oropharyngeal dysphagia with the potentially stimulated target and their clinical study reference.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Serra-Prat, M., G. Hinojosa, D. López, *et al.* 2011. Prevalence of oropharyngeal dysphagia and impaired safety and efficacy of swallow in independently living older persons. *J. Am. Geriatr. Soc.* **59**: 186–187.
- Lin, L.C., S.C. Wu, H.S. Chen, *et al.* 2002. Prevalence of impaired swallowing in institutionalized older people in Taiwan. *J. Am. Geriatr. Soc.* **50**: 1118–1123.
- Clavé, P. & R. Shaker. 2015. Dysphagia: current reality and scope of the problem. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **12**: 259–270.
- Rofes, L., N. Vilardell & P. Clavé. 2013. Post-stroke dysphagia: progress at last. *Neurogastroenterol. Motil.* **25**: 278–282.
- Martino, R., N. Foley, S. Bhogal, *et al.* 2005. Dysphagia after stroke: incidence, diagnosis, and pulmonary complications. *Stroke* **36**: 2756–2763.
- Kalf, J.G., B.J.M. de Swart, B.R. Bloem & M. Munneke. 2012. Prevalence of oropharyngeal dysphagia in Parkinson's disease: a meta-analysis. *Parkinsonism Relat. Disord.* **18**: 311–315.
- Langmore, S.E., R.K. Olney, C. Lomen-Hoerth & B.L. Miller. 2007. Dysphagia in patients with frontotemporal lobar dementia. *Arch. Neurol.* **64**: 58–62.

8. Rofes, L., V. Arreola, M. Romea, *et al.* 2010. Pathophysiology of oropharyngeal dysphagia in the frail elderly. *Neurogastroenterol. Motil.* **22**: 851–858, e230.
9. Serra-Prat, M., M. Palomera, C. Gomez, *et al.* 2012. Oropharyngeal dysphagia as a risk factor for malnutrition and lower respiratory tract infection in independently living older persons: a population-based prospective study. *Age Ageing* **41**: 376–381.
10. Clavé, P., M. de Kraa, V. Arreola, *et al.* 2006. The effect of bolus viscosity on swallowing function in neurogenic dysphagia. *Aliment Pharmacol. Ther.* **24**: 1385–1394.
11. Speyer, R., L. Baijens, M. Heijnen & I. Zwijnenberg. 2010. Effects of therapy in oropharyngeal dysphagia by speech and language therapists: a systematic review. *Dysphagia* **25**: 40–65.
12. Aviv, J.E. 1997. Effects of aging on sensitivity of the pharyngeal and supraglottic areas. *Am. J. Med.* **103**: 74S–76S.
13. Aviv, J.E., J.H. Martin, R.L. Sacco, *et al.* 1996. Supraglottic and pharyngeal sensory abnormalities in stroke patients with dysphagia. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **105**: 92–97.
14. Hammer, M.J., C.A. Murphy & T.M. Abrams. 2013. Airway somatosensory deficits and dysphagia in Parkinson's disease. *J. Parkinsons Dis.* **3**: 39–44.
15. Leow, L.P., L. Beckert, T. Anderson & M.-L. Huckabee. 2012. Changes in chemosensitivity and mechanosensitivity in aging and Parkinson's disease. *Dysphagia* **27**: 106–114.
16. Logemann, J.A., B.R. Pauloski, L. Colangelo, *et al.* 1995. Effects of a sour bolus on oropharyngeal swallowing measures in patients with neurogenic dysphagia. *J. Speech Hear. Res.* **38**: 556–563.
17. Ebihara, T., S. Ebihara, M. Maruyama, *et al.* 2006. A randomized trial of olfactory stimulation using black pepper oil in older people with swallowing dysfunction. *J. Am. Geriatr. Soc.* **54**: 1401–1406.
18. Ebihara, T., H. Takahashi, S. Ebihara, *et al.* 2005. Capsaicin troche for swallowing dysfunction in older people. *J. Am. Geriatr. Soc.* **53**: 824–828.
19. Ebihara, T., S. Ebihara, A. Watando, *et al.* 2006. Effects of menthol on the triggering of the swallowing reflex in elderly patients with dysphagia. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **62**: 369–371.
20. Ebihara, T., S. Ebihara, M. Yamazaki, *et al.* 2010. Intensive stepwise method for oral intake using a combination of transient receptor potential stimulation and olfactory stimulation inhibits the incidence of pneumonia in dysphagic older adults. *J. Am. Geriatr. Soc.* **58**: 196–198.
21. Rofes, L., V. Arreola, A. Martin & P. Clavé. 2014. Effect of oral piperine on the swallow response of patients with oropharyngeal dysphagia. *J. Gastroenterol.* **49**: 1517–1523.
22. Sdravou, K., M. Walshe & L. Dagdilelis. 2012. Effects of carbonated liquids on oropharyngeal swallowing measures in people with neurogenic dysphagia. *Dysphagia* **27**: 240–250.
23. Theurer, J.A., J.L. Johnston, J. Fisher, *et al.* 2013. Proof-of-principle pilot study of oropharyngeal air-pulse application in individuals with dysphagia after hemispheric stroke. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* **94**: 1088–1094.
24. Watando, A., S. Ebihara, T. Ebihara, *et al.* 2004. Effect of temperature on swallowing reflex in elderly patients with aspiration pneumonia. *J. Am. Geriatr. Soc.* **52**: 2143–2144.
25. Kaatzke-McDonald, M.N., E. Post & P.J. Davis. 1996. The effects of cold, touch, and chemical stimulation of the anterior faucial pillar on human swallowing. *Dysphagia* **11**: 198–206.
26. Rosenbek, J.C., J. Robbins, W.O. Willford, *et al.* 1998. Comparing treatment intensities of tactile-thermal application. *Dysphagia* **13**: 1–9.
27. Rofes, L., V. Arreola, I. López, *et al.* 2013. Effect of surface sensory and motor electrical stimulation on chronic poststroke oropharyngeal dysfunction. *Neurogastroenterol. Motil.* **25**: 888–e701.
28. Jayasekeran, V., S. Singh, P. Tyrrell, *et al.* 2010. Adjunctive functional pharyngeal electrical stimulation reverses swallowing disability after brain lesions. *Gastroenterology* **138**: 1737–1746.
29. Jean, A. 2001. Brain stem control of swallowing: neuronal network and cellular mechanisms. *Physiol. Rev.* **81**: 929–969.
30. Rofes, L., P. Cola & P. Clavé. 2014. The effects of sensory stimulation on neurogenic oropharyngeal dysphagia. *J. Gastroenterol. Hepatol. Res.* **3**: 1066–1072.
31. Mu, L. & I. Sanders. 2000. Sensory nerve supply of the human oro- and laryngopharynx: a preliminary study. *Anat. Rec.* **258**: 406–420.
32. Zur, K.B., L. Mu & I. Sanders. 2004. Distribution pattern of the human lingual nerve. *Clin. Anat.* **17**: 88–92.
33. Doty, R.L., D.M. Cummins, A. Shibanova, *et al.* 2009. Lingual distribution of the human glossopharyngeal nerve. *Acta Otolaryngol.* **129**: 52–56.
34. Yatake, Y. & I. Hiroto. 1968. Anatomical study on the laryngeal nerves of mammals. *Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* **71**: 212–216.
35. Sanders, I. & L. Mu. 1998. Anatomy of the human internal superior laryngeal nerve. *Anat. Rec.* **252**: 646–656.
36. Olthoff, A., R. Schiel & E. Kruse. 2007. The supraglottic nerve supply: an anatomic study with clinical implications. *Laryngoscope* **117**: 1930–1933.
37. Teismann, I.K., O. Steinstraeter, K. Stoeckigt, *et al.* 2007. Functional oropharyngeal sensory disruption interferes with the cortical control of swallowing. *BMC Neurosci.* **8**: 62.
38. Ding, P., R. Campbell-Malone, S.D. Holman, *et al.* 2013. Unilateral superior laryngeal nerve lesion in an animal model of dysphagia and its effect on sucking and swallowing. *Dysphagia* **28**: 404–412.
39. Nagai, H., F. Ota & N.P. Connor. 2005. Effect of deficits in laryngeal sensation on laryngeal muscle biochemistry. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **114**: 352–360.
40. Sañudo, J.R., E. Marañillo, X. León, *et al.* 1999. An anatomical study of anastomoses between the laryngeal nerves. *Laryngoscope* **109**: 983–987.
41. Gartner, L.P. 1994. Oral anatomy and tissue types. *Semin. Dermatol.* **13**: 68–73.
42. Squier, C.A. & M.J. Kremer. 2001. Biology of oral mucosa and esophagus. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 7–15.
43. Stone, L.M., T.E. Finger, P.P. Tam & S.S. Tan. 1995. Taste receptor cells arise from local epithelium, not neurogenic ectoderm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 1916–1920.

44. Okubo, T., C. Clark & B.L.M. Hogan. 2009. Cell lineage mapping of taste bud cells and keratinocytes in the mouse tongue and soft palate. *Stem Cells* **27**: 442–450.
45. Roper, S.D. 1989. The cell biology of vertebrate taste receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **12**: 329–353.
46. Chaudhari, N. & S.D. Roper. 2010. The cell biology of taste. *J. Cell Biol.* **190**: 285–296.
47. Vandenbeuch, A., T.R. Clapp & S.C. Kinnamon. 2008. Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse. *BMC Neurosci.* **9**: 1.
48. Zhang, Y., M.A. Hoon, J. Chandrashekar, *et al.* 2003. Coding of sweet, bitter, and umami tastes: Different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* **112**: 293–301.
49. Tomchik, S.M., S. Berg, J.W. Kim, *et al.* 2007. Breadth of tuning and taste coding in mammalian taste buds. *J. Neurosci.* **27**: 10840–10848.
50. Yee, C.L., R. Yang, B. Böttger, *et al.* 2001. “Type III” cells of rat taste buds: immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5, and serotonin. *J. Comp. Neurol.* **440**: 97–108.
51. Witt, M. & K. Reutter. 1997. Scanning electron microscopic studies of developing gustatory papillae in humans. *Chem. Senses* **22**: 601–612.
52. Watanabe, I. & E. Yamada. 1985. A light and electron microscopic study of lamellar nerve endings found in the rat cheek mucosa. *Arch. Histol. Jpn.* **48**: 497–504.
53. Watanabe, I. 1982. Fine structure of lamellar nerve endings in the gingiva of man and the *Cebus apella* monkey. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* **59**: 181–198.
54. Watanabe, I. 2004. Ultrastructures of mechanoreceptors in the oral mucosa. *Anat. Sci. Int.* **79**: 55–61.
55. Munger, B.L. & C. Ide. 1988. The structure and function of cutaneous sensory receptors. *Arch. Histol. Cytol.* **51**: 1–34.
56. Hashimoto, K. 1972. Fine structure of Merkel cell in human oral mucosa. *J. Invest. Dermatol.* **58**: 381–387.
57. Bengoechea Gonzalez, M.E., A. Alvarez Arenal, A. Perez Casas, *et al.* 1989. Microscopic innervation and nerve receptors of the lingual mucosa. *Rev. Eur. Odontostomatol.* **1**: 123–130.
58. Chouchkov, C.N. 1973. On the fine structure of Krause’s bulbs in human skin, oral cavity and rectum. *Arch. Histol. Jpn.* **35**: 365–375.
59. Lawrenson, J.G. & G.L. Ruskell. 1991. The structure of corpuscular nerve endings in the limbal conjunctiva of the human eye. *J. Anat.* **177**: 75–84.
60. Munger, B.L. 1965. The intraepidermal innervation of the snout skin of the opossum. A light and electron microscope study, with observations on the nature of Merkel’s Tastzellen. *J. Cell Biol.* **26**: 79–97.
61. Beach, T.G., C.H. Adler, L.I. Sue, *et al.* 2010. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol.* **119**: 689–702.
62. Mu, L., S. Sobotka, J. Chen, *et al.* 2013. Parkinson disease affects peripheral sensory nerves in the pharynx. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **72**: 614–623.
63. Mu, L., S. Sobotka, J. Chen, *et al.* 2013. Alpha-synuclein pathology and axonal degeneration of the peripheral motor nerves innervating pharyngeal muscles in Parkinson disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **72**: 119–129.
64. Mu, L., J. Chen, S. Sobotka, *et al.* 2015. Alpha-synuclein pathology in sensory nerve terminals of the upper aerodigestive tract of Parkinson’s disease patients. *Dysphagia* **30**: 404–417.
65. Watanabe, I. & E. Yamada. 1983. The fine structure of lamellar nerve endings found in the rat gingiva. *Arch. Histol. Jpn.* **46**: 173–182.
66. Toyoshima, K., K. Miyamoto & A. Shimamura. 1987. The ultrastructure of encapsulated sensory corpuscles in the fungiform papillae of monkeys. *Arch. Histol. Jpn.* **50**: 385–392.
67. Smith, K.R. 1970. The ultrastructure of the human Haarscheibe and Merkel cell. *J. Invest. Dermatol.* **54**: 150–159.
68. Toyoshima, K., K. Miyamoto, A. Itoh & A. Shimamura. 1987. Merkel–neurite complexes in the fungiform papillae of two species of monkeys. *Cell Tissue Res.* **250**: 237–239.
69. Shin, T., S. Watanabe, S. Wada & T. Maeyama. 1987. Sensory nerve endings in the mucosa of the epiglottis—morphologic investigations with silver impregnation, immunohistochemistry, and electron microscopy. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **96**: 55–62.
70. Chiba, T., S. Watanabe & T. Shin. 1985. Ultrastructure of the glomerular corpuscular nerve endings in the subepithelium of human epiglottis. *Arch. Histol. Jpn.* **48**: 213–221.
71. Watanabe, I. & E. Yamada. 1984. Unusual nerve endings found in the rat palatine mucosa. *Arch. Histol. Jpn.* **47**: 187–196.
72. Luzardo-Baptista, M. 1973. Intraepithelial nerve fibers in the human oral mucosa. An electron microscopic study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **35**: 372–376.
73. Viana, F. 2011. Chemosensory properties of the trigeminal system. *ACS Chem. Neurosci.* **2**: 38–50.
74. Denda, M., S. Fuziwara, K. Inoue, *et al.* 2001. Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**: 1250–1252.
75. Caterina, M.J., M. Schumacher, M. Tominaga, *et al.* 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**: 816–824.
76. O’Neill, J., C. Brock, A.E. Olesen, *et al.* 2012. Unravelling the mystery of capsaicin: a tool to understand and treat pain. *Pharmacol. Rev.* **64**: 939–971.
77. Southall, M.D., T. Li, L.S. Gharibova, *et al.* 2003. Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **304**: 217–222.
78. Tachibana, T. & H. Chiba. 2006. Relationship between glosodynia and capsaicin sensitive sensory neurons. *J. Jpn. Stomatol. Soc.* **55**: 167–178.
79. Kawashima, M., K. Imura & I. Sato. 2012. Topographical organization of TRPV1-immunoreactive epithelium and CGRP-immunoreactive nerve terminals in rodent tongue. *Eur. J. Histochem.* **56**: 129–134.
80. Marincsak, R., B. Tóth, G. Czifra, *et al.* 2009. Increased expression of TRPV1 in squamous cell carcinoma of the human tongue. *Oral Dis.* **15**: 328–335.

81. Hamamoto, T., M. Takumida, K. Hirakawa, *et al.* 2009. Localization of transient receptor potential vanilloid (TRPV) in the human larynx. *Acta Otolaryngol.* **129**: 560–568.
82. Hamamoto, T., M. Takumida, K. Hirakawa, *et al.* 2008. Localization of transient receptor potential channel vanilloid subfamilies in the mouse larynx. *Acta Otolaryngol.* **128**: 685–693.
83. Alvarez-Berdugo, D., L. Rofes, R. Farré, *et al.* 2016. Localization and expression of TRPV1 and TRPA1 in the human oropharynx and larynx. *Neurogastroenterol. Motil.* **28**: 91–100.
84. Sasaki, R., T. Sato, T. Yajima, *et al.* 2013. The distribution of TRPV1 and TRPV2 in the rat pharynx. *Cell Mol. Neurobiol.* **33**: 707–714.
85. Peier, A.M., A. Moqrich, A.C. Hergarden, *et al.* 2002. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* **108**: 705–715.
86. Story, G.M., A.M. Peier, A.J. Reeve, *et al.* 2003. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**: 819–829.
87. Bautista, D.M., J. Siemens, J.M. Glazer, *et al.* 2007. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* **448**: 204–208.
88. Karashima, Y., N. Damann, J. Prenen, *et al.* 2007. Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. *J. Neurosci.* **27**: 9874–9884.
89. Bautista, D.M., S.E. Jordt, T. Nikai, *et al.* 2006. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* **124**: 1269–1282.
90. Knowlton, W.M., A. Bifolck-Fisher, D.M. Bautista & D.D. McKemy. 2010. TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics *in vivo*. *Pain* **150**: 340–350.
91. Colburn, R.W., L.M. Lou, D.J. Stone, *et al.* 2007. Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* **54**: 379–386.
92. Bandell, M., G.M. Story, S.W. Hwang, *et al.* 2004. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* **41**: 849–857.
93. Kobayashi, K., T. Fukuoka, K. Obata, *et al.* 2005. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with A δ /C-fibers and colocalization with Trk receptors. *J. Comp. Neurol.* **493**: 596–606.
94. Abe, J., H. Hosokawa, M. Okazawa, *et al.* 2005. TRPM8 protein localization in trigeminal ganglion and taste papillae. *Mol. Brain Res.* **136**: 91–98.
95. Sato, T., M. Fujita, M. Kano, *et al.* 2013. The distribution of transient receptor potential melastatin-8 in the rat soft palate, epiglottis, and pharynx. *Cell. Mol. Neurobiol.* **33**: 161–165.
96. Peyrot des Gachons, C., K. Uchida, B. Bryant, *et al.* 2011. Unusual pungency from extra-virgin olive oil is attributable to restricted spatial expression of the receptor of oleocanthal. *J. Neurosci.* **31**: 999–1009.
97. Atoyan, R., D. Shander & N.V. Botchkareva. 2009. Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin. *J. Invest. Dermatol.* **129**: 2312–2315.
98. Tsumura, M., U. Sobhan, M. Sato, *et al.* 2013. Functional expression of TRPM8 and TRPA1 channels in rat odontoblasts. *PLoS One* **8**: e82233.
99. Caterina, M.J., T.A. Rosen, M. Tominaga, *et al.* 1999. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* **398**: 436–441.
100. Xu, H., I.S. Ramsey, S.A. Kotecha, *et al.* 2002. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* **418**: 181–186.
101. Alessandri-Haber, N., J.J. Yeh, A.E. Boyd, *et al.* 2003. Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. *Neuron* **39**: 497–511.
102. Alessandri-Haber, N., O.A. Dina, X. Chen & J.D. Levine. 2009. TRPC1 and TRPC6 channels cooperate with TRPV4 to mediate mechanical hyperalgesia and nociceptor sensitization. *J. Neurosci.* **29**: 6217–6228.
103. Peier, A.M., A.J. Reeve, D.A. Andersson, *et al.* 2002. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* **296**: 2046–2049.
104. Chung, M.-K., H. Lee, A. Mizuno, *et al.* 2004. TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **279**: 21569–21575.
105. Xu, H., M. Delling, J.C. Jun & D.E. Clapham. 2006. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat. Neurosci.* **9**: 628–635.
106. Delany, N.S., M. Hurler, P. Facer, *et al.* 2001. Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2. *Physiol. Genomics* **4**: 165–174.
107. Guarino, M.P.L., L. Cheng, J. Ma, *et al.* 2010. Increased TRPV1 gene expression in esophageal mucosa of patients with non-erosive and erosive reflux disease. *Neurogastroenterol. Motil.* **22**: 746–751, e219.
108. Kitagawa, J.-I., T. Shingai, Y. Takahashi & Y. Yamada. 2002. Pharyngeal branch of the glossopharyngeal nerve plays a major role in reflex swallowing from the pharynx. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **282**: R1342–R1347.
109. Jafari, S., R.A. Prince, D.Y. Kim & D. Paydarfar. 2003. Sensory regulation of swallowing and airway protection: a role for the internal superior laryngeal nerve in humans. *J. Physiol.* **550**(Pt. 1): 287–304.
110. Kitagawa, J., K. Nakagawa, M. Hasegawa, *et al.* 2009. Facilitation of reflex swallowing from the pharynx and larynx. *J. Oral Sci.* **51**: 167–171.
111. Takahashi, K., T. Shingai, I. Saito, *et al.* 2014. Facilitation of the swallowing reflex with bilateral afferent input from the superior laryngeal nerve. *Neurosci. Lett.* **562**: 50–53.
112. Ding, P., R. Campbell-Malone, S.D. Holman, *et al.* 2013. The effect of unilateral superior laryngeal nerve lesion on swallowing threshold volume. *Laryngoscope* **123**: 1942–1947.
113. Pauloski, B.R., J.A. Logemann, A.W. Rademaker, *et al.* 2013. Effects of enhanced bolus flavors on oropharyngeal swallow in patients treated for head and neck cancer. *Head Neck* **35**: 1124–1131.
114. Tominaga, M., M.J. Caterina, A.B. Malmberg, *et al.* 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**: 531–543.

115. Groneberg, D.A., A. Niimi, Q.T. Dinh, *et al.* 2004. Increased expression of transient receptor potential vanilloid-1 in airway nerves of chronic cough. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **170**: 1276–1280.
116. Rofes, L., V. Arreola, A. Martin & P. Clavé 2013. Natural capsaicinoids improve swallow response in older patients with oropharyngeal dysphagia. *Gut* **62**: 1280–1287.
117. Myers, M.I., A.C. Peltier & J. Li 2013. Evaluating dermal myelinated nerve fibers in skin biopsy. *Muscle Nerve* **47**: 1–11.
118. Hou, M., R. Uddman, J. Tajti, *et al.* 2002. Capsaicin receptor immunoreactivity in the human trigeminal ganglion. *Neurosci. Lett.* **330**: 223–226.
119. Bautista, D.M., P. Movahed, A. Hinman, *et al.* 2005. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 12248–12252.
120. Yoshida, Y., Y. Tanaka, M. Hirano & T. Nakashima 2000. Sensory innervation of the pharynx and larynx. *Am. J. Med.* **108**(Suppl. 4a): 51S–61S.
121. Renner, B., G. Ahne, E. Grosan, *et al.* 2013. Tonic stimulation of the pharyngeal mucosa causes pain and a reversible increase of inflammatory mediators. *Inflamm. Res.* **62**: 1045–1051.
122. Nakagawa, T., T. Ohru, K. Sekizawa & H. Sasaki. 1995. Sputum substance P in aspiration pneumonia. *Lancet* **345**: 1447.
123. Arai, T., N. Yoshimi, H. Fujiwara & K. Sekizawa 2003. Serum substance P concentrations and silent aspiration in elderly patients with stroke. *Neurology* **61**: 1625–1626.
124. Maccarrone, M., M. Di Rienzo, N. Battista, *et al.* 2003. The endocannabinoid system in human keratinocytes. Evidence that anandamide inhibits epidermal differentiation through CB1 receptor-dependent inhibition of protein kinase C, activation protein-1, and transglutaminase. *J. Biol. Chem.* **278**: 33896–33903.
125. Ahluwalia, J., L. Urban, S. Bevan & I. Nagy. 2003. Anandamide regulates neuropeptide release from capsaicin-sensitive primary sensory neurons by activating both the cannabinoid 1 receptor and the vanilloid receptor 1 *in vitro*. *Eur. J. Neurosci.* **17**: 2611–2618.
126. Setzen, M., M.A. Cohen, P.W. Perlman, *et al.* 2003. The association between laryngopharyngeal sensory deficits, pharyngeal motor function, and the prevalence of aspiration with thin liquids. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **128**: 99–102.
127. Paydarfar, D. 2011. Protecting the airway during swallowing: what is the role for afferent surveillance? *Head Neck* **33**(Suppl. 1): S26–S29.
128. Gomis, A. 2015. “TRP channels and mechanical transduction.” In *TRP Channels in Sensory Transduction*. R. Madrid & J. Bacigalupo, Eds.: 141–163. Cham: Springer International Publishing.



HOSPITAL DE MATARÓ
CONSORCI SANITARI DEL MARESME

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Don **MATEU SERRA PRAT**, Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital de Mataró, Consorci Sanitari del Maresme

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta realizada por el **Dr. P. Clavé** para que sea realizado en este centro el proyecto de investigación titulado: **Efecto de los agonistas naturales del receptor trpv1 en el tratamiento de la disfagia orofaríngea funcional en enfermedades neurológicas y ancianos.**

con los medicamentos: _____

y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.

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

Y que este Comité acepta que dicho estudio sea realizado en el Hospital de Mataró, Consorci Sanitari del Maresme por el **Dr. P. Clavé**, como Investigador Principal.

Lo que firmo en Mataró a 22 de abril de 2009

Firmado:

Don Mateu Serra-Prat
Presidente CEIC



HOSPITAL DE MATARÓ
CONSORCI SANITARI DEL MARESME

Carretera de Cirera, s/n 08304 Mataró
Tel. 93 741 77 00 Fax 93 741 77 33

INFORME DEL COMITÈ ÈTIC D'INVESTIGACIÓ CLÍNICA

El Dr. **MATEU SERRA PRAT**, Secretari del Comitè Ètic d'Investigació Clínica de l'Hospital de Mataró, Consorci Sanitari del Maresme

CERTIFICA

Que aquest Comitè va avaluar i aprovar en data 22/04/2009 el projecte titulat **Efecto de los agonistas naturales del receptor trpv1 en el tratamiento de la disfagia orofaríngea funcional en enfermedades neurológicas y ancianos.**

Que en data 26/11/2014 ha avaluat i aprovat el nou Full d'Informació al Pacient i de Consentiment de data 4-11-14.

Aquest estudi s'està duent a terme a l'Hospital de Mataró, Consorci Sanitari del Maresme, pel **Dr. Pere Clavé Civit**, com a investigador principal.

En Mataró a 26 de novembre de 2014

Firmat:

Dr. Mateu Serra Prat
Secretari del CEIC del CSdM



Germans Trias i Pujol Hospital

Comitè d'Ètica de la Investigació

Crta. De Canyet, s/n - 08916 Badalona
Tel. 93 497.89.56 Fax 93 497.89.74
E-mail: ceic.germanstrias@gencat.cat

A/A.: Daniel Alvarez Berdugo

Laboratori CIBERehd Fisiologia Digestiva (Consorti Sanitari del Maresme - Hospital de Mataró)

Muralla de Sant Llorenç, 15

08302 - Mataró

CÓDIGO	PI14/00453	PROMOTOR	Dr. Pere Clavé (Consorti Sanitari del Maresme - Hospital de Mataró)	REF. CEI	PI-16-049
TÍTULO: Desarrollo de un protocolo de neuromodulación sensorial para el tratamiento de la disfagia orofaríngea post-ictus. Efectos a corto y largo plazo. Versión que incorpora las modificaciones propuestas por el CEIC en la reunión del día 18 de marzo de 2016					
INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dra. Constanza Viña Soria					

El Dr. Magí Farré Albaladejo, Presidente del Comité de Ética de la Investigación del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

CERTIFICA

Que en la reunión de fecha 29 de abril de 2016 se aprobó el estudio arriba mencionado cumpliendo los requisitos establecidos en la legislación vigente para que la decisión del citado CEI sea válida.

Que en el supuesto que algún miembro del CEI sea investigador principal o colaborador del estudio evaluado, éste se ausentará de la reunión durante la deliberación y toma de decisión.

Que el CEI, tanto en su composición como en los PNT, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y que su composición actual es la siguiente:

Presidente

Farré Albaladejo, Magí. Farmacología Clínica

Vicepresidenta

Balañá Quintero, Carme. Oncología Médica (ICO)

Secretaria

López Andrés, Anna. Farmacología Clínica (IGTP)

Secretaria Técnica

Fortes Villegas, Àngels. (IGTP)

Vocales

Avecilla Palau, M^a Àngels. Ginecología y Obstetricia (BSA)

Bayés Genís, Beatriu. Dirección de Centro

Cabrera Jaime, Sandra. Enfermería

Casanovas Cuellar, Cristina. Enfermería

Dachary Jiménez, Natàlia. Jurista

Jiménez López, Irene. Unidad de Atención a la Ciudadanía

López Sisamón, David. Farmacia (ICO)

Montané Esteva, Eva. Farmacología Clínica

Oriol Rocafiguera, Albert. Hematología y Hemoterapia (ICO)

Palomo Nicolau, Antonio. Psiquiatría. (CEM)

Peláez de Loño, Jordi. Farmacia (CATSALUT)

Pérez Reche, Cristina. Farmacia

Puyalto Depablo, Paloma. Radiología

Ramo Tello, Cristina. Neurología

Romeu Fontanillas, Joan. Medicina Interna - VIH

Sánchez Fernández, M^a del Carmen. Biología-Genética (IC)

Solà Suárez, Montserrat. Medicina Nuclear

Atentamente,

Dr. Magí Farré Albaladejo
Presidente CEI
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

Badalona, 29 de abril de 2016
MFA/llg

c.c. Dra. Constanza Viña Soria

Generalitat de Catalunya
Departament de Salut



Germans Trias i Pujol
Hospital
Institut Català de la Salut

Comitè d'Ètica de la Investigació



HOSPITAL DE MATARÓ
CONSORCI SANITARI DEL MARESME

INFORME DEL COMITÈ ÈTIC D'INVESTIGACIÓ CLÍNICA

D^a **CLARA AGUSTÍ MARAGALL**, Secretaria del Comitè Ètic d'Investigació Clínica de l'Hospital de Mataró, Consorci Sanitari del Maresme

CERTIFICA

Que aquest Comitè ha avaluat la proposta realitzada pel promotor **Dr. P. Clavé**, per tal que sigui realitzat en el nostre centre el següent estudi: **Evaluación videofluoroscópica del efecto terapéutico de la salsa de tabasco en pacientes con disfagia orofaríngea.**

amb els medicaments: —

i considera que:

Es compleixen els requisits necessaris d'idoneïtat del protocol en relació amb els objectius de l'estudi i estan justificats els riscos i molèsties previsibles per al subjecte.

La capacitat de l'investigador i els mitjans disponibles són apropiats per a dur a terme l'estudi.

El procediment per a obtenir el Consentiment Informat és adequat.

I que aquest Comitè accepta que aquest estudi sigui realitzat a l'Hospital de Mataró, Consorci Sanitari del Maresme per la **Dra. Laia Rofes**, com a Investigadora Principal.

Ho firmo a Mataró a 24 de setembre de 2008

Firmat:

D^a. Clara Agustí Maragall
Secretaria CEIC del CSdM



HOSPITAL DE MATARÓ
CONSORCI SANITARI DEL MARESME

INFORME DEL COMITÈ ÈTIC D'INVESTIGACIÓ CLÍNICA

El Dr. **MATEU SERRA PRAT**, Secretari del Comitè Ètic d'Investigació Clínica de l'Hospital de Mataró, Consorci Sanitari del Maresme

CERTIFICA

Que aquest Comitè ha avaluat la proposta realitzada per la **Sra. Lorena Molina Raya** per tal que sigui realitzat en el nostre centre el projecte de recerca titulat: **Efecte dels agonistes naturals dels receptors TRPM8 en el tractament de la disfàgia orofaríngia funcional en malalties neurològiques i en ancians: el Mentol. Codi de protocol MA01-11/2012** (*Protocol i Full d'Informació al pacient i consentiment informat versió 2, gener 2013*).

amb els medicaments: ----

i considera que:

Es compleixen els requisits necessaris d'idoneïtat del protocol en relació amb els objectius de l'estudi i estan justificats els riscos i molèsties previsibles per al subjecte.

La capacitat de l'investigador i els mitjans disponibles són apropiats per a dur a terme l'estudi.

El procediment per a obtenir el Consentiment Informat és adequat.

I que aquest Comitè accepta que aquest projecte de recerca sigui realitzat a l'Hospital de Mataró, Consorci Sanitari del Maresme per la **Sra. L. Molina**, com a Investigadora Principal.

Ho firmo a Mataró a 27 de febrer de 2013

Firmat:

Mateu Serra Prat
Secretari CEIC del CSdM

Localization and expression of TRPV1 and TRPA1 in the human oropharynx and larynx

D. ALVAREZ-BERDUGO,* L. ROFES,† R. FARRÉ,‡,§ J. F. CASAMITJANA,§ A. ENRIQUE,§ J. CHAMIZO,§ A. PADRÓN,¶ X. NAVARRO** & P. CLAVÉ*,†,††

*Gastrointestinal Motility Laboratory, Hospital de Mataró, Consorci Sanitari del Maresme, Mataró, Spain

†Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain

‡Translational Research Center for Gastrointestinal Disorders, KU Leuven - University of Leuven, Leuven, Belgium

§ENT Department, Hospital de Mataró, Consorci Sanitari del Maresme, Mataró, Spain

¶Department of Pathology, Hospital de Mataró, Consorci Sanitari del Maresme, Mataró, Spain

**Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Institute of Neurosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, Bellaterra, Spain

††Fundació Institut de Investigació Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

Key Messages

- Previous studies have provided supportive evidence to suggest that TRPV1 and TRPA1 agonists improve swallow response on neurogenic OD patients, but little is known about the expression and localization of these receptors in the oropharynx.
- This study explores the expression and localization of TRPV1 and TRPA1 in human oropharyngeal samples with RT-qPCR and fluorescent immunohistochemistry.
- TRPV1 and TRPA1 expression is found throughout the oropharynx and these receptors are immunolocalized with two specific patterns. TRPV1 is found on epithelial cells and submucosal sensory nerves, whereas TRPA1 is only found below the basal lamina.
- Oropharyngeal TRPV1/A1 receptors are promising therapeutic targets to develop active treatments for OD patients.

Abstract

Background Previous studies have found that TRPV1 and TRPA1 receptor agonists improve swallow response in patients with oropharyngeal dysphagia (OD), but little is known about the expression of these receptors in the human oropharynx. The aim of this study was to assess the expression and localization of TRPV1 and TRPA1 in human samples from the oropharynx of healthy patients, to provide the basis

for new pharmacological treatments for OD. **Methods** Samples from oropharyngeal regions innervated by cranial nerves V, IX, and X (tongue, pharynx, and epiglottis) were obtained during ENT surgery and processed either for mRNA (21 patients) or for immunohistochemical assays (seven patients). The expression analysis was performed with RT-qPCR using ACTBh as reference gene. Hematoxylin and eosin staining was used to study the histology; the immunohistochemical assay used (i) neuron-specific enolase to detect nerve fibers or (ii) fluorescent probes to locate TRPV1 and TRPA1. **Results** TRPV1 was expressed in the three studied regions, with higher levels in CN V region (tongue) than in CN X region (epiglottis; $p < 0.05$), and was localized at epithelial cells and nociceptive fibers in all studied regions. TRPA1 was also expressed in all studied regions, but was always localized below the basal lamina. No

Address for Correspondence

Pere Clavé, MD, PhD, Associate Professor of Surgery, Gastrointestinal Physiology Lab, Department of Surgery, Hospital de Mataró, Universitat Autònoma de Barcelona, Carretera de Cirera s/n 08304, Mataró, Spain.

Tel: +34 93 741 77 00; fax: +34 93 741 77 33;

e-mail: pere.clave@ciberehd.org

Received: 29 June 2015

Accepted for publication: 8 September 2015

immunoreactivity for TRPA1 was found on epithelial cells. Conclusions & Inferences TRPV1 and TRPA1 are widely expressed in the human oropharynx with two distinct patterns. Our study further confirms that TRPV1/A1 receptors are promising therapeutic targets to develop active treatments for OD patients.

Keywords Ankyrin-like with transmembrane domains protein 1, oropharyngeal dysphagia, sensory input, vanilloid receptor 1.

INTRODUCTION

Oropharyngeal dysphagia (OD) is a geriatric syndrome affecting 23% of independently living and up to 51% of institutionalized older people.^{1–3} Oropharyngeal dysphagia causes two groups of clinically relevant complications: decreased efficacy of swallowing that can lead to malnutrition and dehydration, and decreased safety of deglutition that can involve bolus penetration into the laryngeal vestibule and, in the most severe cases, tracheobronchial aspiration, leading to aspiration pneumonia.^{4,5} Oropharyngeal dysphagia is also a highly frequent poststroke complaint with an incidence of over 40%^{6,7} and is a common condition in patients with neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's disease, with reported prevalence of 35–82% and 19–84%, respectively.^{8,9} There is no pharmacological treatment for OD yet and its management is mainly based on compensatory strategies such as food and liquid bolus adaptation, postures, and swallow maneuvers.^{10,11}

Old and neurogenic patients with OD present decreased sensitivity in the oropharynx.^{12,13} Afferent myelinated nerve fibers in the superior laryngeal nerve have been observed to decrease with age and may be the cause of age-related sensory dysfunction of the oropharynx.^{14,15} In stroke patients, lack of sensitivity could be caused by interference in the connection between the sensory afferents and the cortex and the brainstem¹⁶ and the disruption of afferent information processing at the cortex due to cortical lesion. These sensory deficits may lead to delayed swallowing response⁴ and predispose to aspiration and aspiration pneumonia.¹⁷

It has been hypothesized that increasing the sensory input in these patients could modulate the cortical swallowing motor pathway and thus improve the swallowing response.^{18,19} This hypothesis led us to perform clinical assays to test capsaicinoids (TRPV1 agonist) and piperine (TRPV1/A1 agonist) as a pharmacological approach to treat OD, with the results that swallow safety and efficacy were significantly

increased by improved oropharyngeal motor response.^{20,21} However, more knowledge is needed about the mechanisms by which this approach works.

Caterina *et al.* identified the transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1 (TRPV1) as the vanilloid receptor²² and, since then, TRPV1 expression has been found in several human tissues; in neuronal tissues such as the dorsal root ganglia²³ and the trigeminal ganglia,²⁴ and also in epithelial cells like bladder epithelial cells in the human urothelium²⁵ and keratinocytes of human epidermis.²⁶ Following TRPV1 identification, several polymodal receptors have been identified. Among them, Story *et al.* identified the transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1 (TRPA1) as a cold activated receptor.²⁷ TRPA1 is also activated by piperine and low concentrations of menthol.^{28,29} However, little is known about the expression and localization of TRPV1 and TRPA1 within the human oropharynx.

The aim of this study was to explore the expression and localization of TRPV1 and TRPA1 in areas of the human oropharynx, including those innervated by trigeminal (cranial nerve V), glossopharyngeal (cranial nerve IX), and vagus (cranial nerve X) nerves. This knowledge may provide the basis to develop specific pharmacologic strategies with TRPV1 and TRPA1 agonists to treat patients with OD.

PATIENTS, MATERIALS, AND METHODS

Sample collection

Human biopsies were obtained during routine major ENT surgical interventions once patients had granted informed consent. The samples were innervated by cranial nerves V (tongue), IX (faucial pillars and pharynx), and X (pharynx and epiglottis) with an average size of 8 mm × 8 mm × 4 mm for histological procedures and 3 mm × 3 mm × 3 mm for molecular biology procedures. The patients had head and neck cancer located at oral cavity (21.4%), pharynx (17.9%), or larynx (53.6%), more than half of them at early stage (53.8% T1N0M0), or had undergone tonsillectomy for benign disease (7.1%) and had not received chemo- or radiotherapy prior to the surgical intervention; all tissues used in the study were examined to confirm that they were free from pathology. Samples from seven patients (mean age 52.6 ± 16.0, 85.7% males) were processed to study both the histology and the innervation of the oropharynx and to localize TRPV1 and TRPA1 within tissues by immunohistochemistry. Samples from 21 patients (mean age 63.7 ± 11.4, 85.7% males) were processed to quantify TRPV1 and TRPA1 expression through RT-qPCR.

Tissue collection and storage were performed according to the recommendations from the 'Human Tissue Act' of 21 October 2002 in the HHW Department of USA and obeying the current Spanish law about the use and storage of human tissue (Ley 14/2007 Título V Capítulo III). The Ethical Committee of the Consorci Sanitari del Maresme approved the study under the code 22/09.

Histological sample preparation

Samples destined to immunohistochemistry were collected in paraformaldehyde 5% and incubated at 4 °C for 1–2 h. Biopsies were then cut in half, one part for colorimetric and the other for fluorescent immunohistochemistry procedures. The colorimetric immunohistochemistry samples were processed with the routine protocol of infiltration using the Tissue-Tek VIP Vacuum Infiltration Processor and reagents (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) and then oriented by a pathologist and embedded in paraffin blocks. The samples were cut in 4- μ m slices at room temperature and processed. For fluorescent immunohistochemistry, samples were washed with phosphate buffer saline and incubated in cryoprotective solution (20% sucrose in phosphate buffer 0.1 M) at 4 °C O/N, then frozen in Optimal Cutting Temperature compound (Sakura Finetek) and stored at –80 °C until used. The samples were cut in 6–10 μ m slices at –20 °C in a cryostat, set in FLEX IHC microscope slides (Dako, Glostrup, Denmark) and stored at –20 °C until used.³⁰

Colorimetric immunohistochemistry

Histological preparations were dyed with (i) hematoxylin and eosin to examine the structure of oropharyngeal mucosa and submucosa using the Leica ST4020 device and reagents (Leica Biosystems, Nussloch, Germany) or (ii) with colorimetric immunohistochemistry with the anti-Neuron-Specific Enolase antibody to find the location of nerve fibers using the AutostainerLink 48 (Dako). Histological preparations were observed under a Nikon Eclipse E600 optical microscope (Nikon, Tokyo, Japan) and microscopic photographs were taken with an Olympus DP20 digital camera (Olympus, Tokyo, Japan).

Fluorescent immunohistochemistry

To locate TRP receptors, histological preparations were fixed with paraformaldehyde 4% in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 0.1 M, permeated with Triton 0.5%, blocked with HBSS-goat serum 10%, incubated with 1 : 500 dilution of anti-TRPV1 or anti-TRPA1 goat antibody (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) diluted in HBSS-goat serum 10% at 4 °C O/N. They were washed and then incubated with Rb-A568 (Thermo Fisher Scientific Inc., Carlsbad, CA, USA) as secondary antibody diluted in HBSS-Goat serum 10% at 37 °C for 1 h. Finally, preparations were incubated with Hoechst (Thermo Fisher Scientific Inc.) and mounted with Fluoprep (BioMérieux, Rhône-Alpes, France). Histological preparations were observed and recorded with a Leica's laser confocal microscope SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) with 40 \times or 20 \times objectives. Three controls were performed for each antibody in each studied region: one using the antigenic peptide provided by the manufacturer at saturating concentration as blocking control, another without the primary antibody to check for unspecific binding of the secondary antibody and the last one without antibodies to check for tissue autofluorescence.

mRNA extraction

Samples intended for molecular biology were collected in RNeasy lysis solution (Thermo Fisher Scientific Inc.), incubated O/N at 4 °C and stored at –20 °C until used. mRNA was extracted using TRIzol[®] (Thermo Fisher Scientific Inc.) protocol, its purity and concentration was assessed with spectrophotometer and it was stored in DEPC-treated water (Thermo Fisher Scientific Inc.) at –20 °C until used.

Retrotranscription and RT-qPCR

Samples were treated with DNase I recombinant, RNase-free (Roche, Basel, Switzerland) to eliminate all traces of genomic DNA. mRNA was retrotranscribed using Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) to obtain cDNA. The RT-qPCR was performed with a Roche's LightCycler[®] 2.0 using LightCycler[®] TaqMan[®] Master kit (Roche). The PCR programs consisted of a 10-min, 95 °C pre-incubation phase followed by 30–60 amplification cycles with an annealing temperature of 64°. The expression of human β -actin (ACTBh) as reference gene and TRPV1 and TRPA1 as target genes were analyzed by this method. All primers (Table 1) were designed through the Universal Probe Library software (Roche).

Data analysis

The TRPV1 and TRPA1 patterns of localization were analyzed using the mean intensity of signal of two consecutive 10 \times 10 μ m ROIs containing 700 pixels each. These mean intensities were graphed relative to the distance between the most superficial side of the ROIs and the basal lamina. The standard error was calculated for each of these means. TRPV1 and TRPA1 relative expressions to ACTBh were obtained using standard curves of the target and reference genes. The relative expression of all regions was compared using Kruskal–Wallis test and then Mann–Whitney *U*-test was used to confirm differences between pairs; *p* < 0.05 was considered as statistically significant. Results are expressed as the mean relative expression \pm SEM. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

RESULTS

Colorimetric histology

Histology and innervation of the oropharynx Tongue mucosa had the characteristics of masticatory mucosa, with para-keratinized epithelium covering the filiform papillae (Fig. 1A). Pharynx (Fig. 1C) and epiglottis (Fig. 1E) mucosa had the aspect of lining mucosa, with non-keratinized epithelia at the outer layers of the mucosa. The basal lamina was identified between the epithelium and the submucosa in all regions. All regions showed abundant innervation consisting in thick fiber bundles at deep areas of the submucosa and

Table 1 Primers used for the RT-qPCR

Gene	UPL	Primers
β -actin (ACTBh)	64	Left: 5'-ccaaccgcgagaagatga-3' Right: 5'-tccatcacgatgccagt-3'
TRP subfamily V member 1 (TRPV1)	41	Left: 5'-cagctacagtgcagatgcttttctt-3' Right: 5'-atggaagccacatactctgt-3'
TRP subfamily A member 1 (TRPA1)	32	Left: 5'-tcaccatgagctagcagactattt-3' Right: 5'-gagagcgtcctcagaatcg-3'

TRP, transient receptor potential channel; UPL, universal probe library.

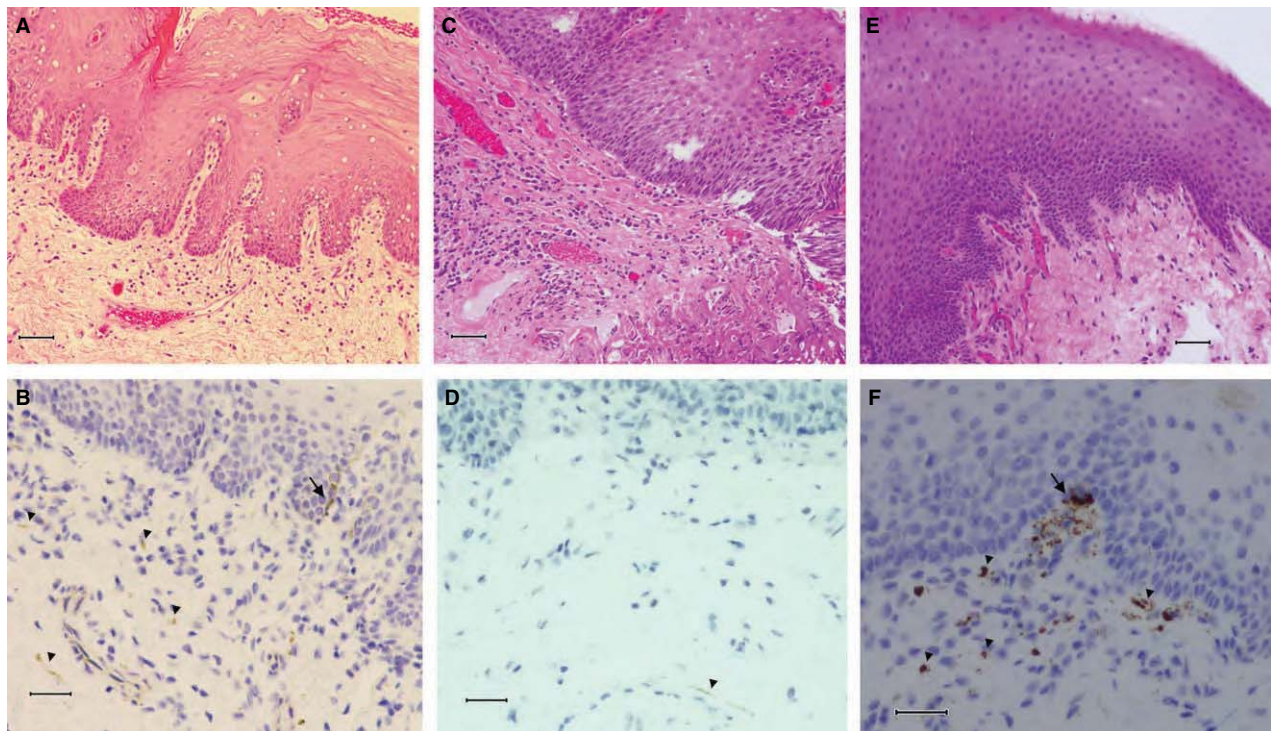


Figure 1 Hematoxylin and eosin stain (HE) (top) and Neuronal Specific Enolase (NSE) (bottom) histological preparations under optical microscope. (A) Mucosa and submucosa of the mid third of the tongue with para-keratinized epithelia over the filiform papillae. (B) Region near A; most nerve fibers travel below the epithelium (arrowheads) and some nerve fibers contact the epithelial cells of the basal layer (arrow). (C and E) Lining mucosa of the posterior wall of the pharynx and the lingual surface of the epiglottis with non-keratinized epithelia. (D) Region near C; a single nerve fiber runs below the basal lamina (arrowhead). (F) Region near E; single fibers and fiber bundles run below the basal lamina (arrowheads) and a sensory nerve structure contacts it (arrow). Top images were obtained under 100 \times and bars measure 50 μm ; bottom images were obtained under 200 \times and bars measure 30 μm .

single fibers approaching the epithelium, some of them reaching the basal lamina in tongue (Fig. 1B) and lingual surface of epiglottis (Fig. 1F). However, no nerve fibers were seen above the basal lamina in any sample of the studied regions.

Fluorescent immunohistochemistry

TRPV1 localization TRPV1 immunofluorescence was localized on the plasma membrane of the epithelial cells in all studied areas, showing a stronger signal in epithelial cells of the basal and intermediate layers and weaker signal on epithelial cells of more superficial and mature layers of the epithelium (Fig. 2). TRPV1 was also found in nociceptive A δ fibers and polymorphonuclear leukocytes in the submucosa near the basal lamina (Fig. 2C). The primary antibody control with specific blocking peptide showed no signal, suggesting that the immunoreactivity found is specific for TRPV1 (data not shown).

TRPA1 localization The TRPA1 was found below the basal lamina in all regions, on cells that morphologi-

cally resembled submucosal fibroblasts. No signal was found on the epithelial cells (Fig. 3). Specificity control of the primary antibody with blocking peptide showed no signal, suggesting that the immunoreactivity was specific for TRPA1 (data not shown).

TRPV1/A1 localization patterns The TRPV1 and TRPA1 showed two distinct patterns of localization in the three areas (CN V, IX, X) of the human oropharynx: TRPV1 was localized in the epithelium with greater intensity near the basal lamina and gradually decreasing toward the superficial layers of the epithelium, and in nerve fibers of the submucosa. In contrast, TRPA1 was only localized in sparse cells and submucosal structures below the basal lamina; the morphology of immunoreactive cells resembled that of fibroblasts (Fig. 4).

RT-qPCR

Quantitative mRNA TRPV1 analysis The relative expression of TRPV1 to β -actin was $25.43 \times 10^{-5} \pm 2.117 \times 10^{-5}$ in the region innervated

TRPV1 and TRPA1 in the human oropharynx

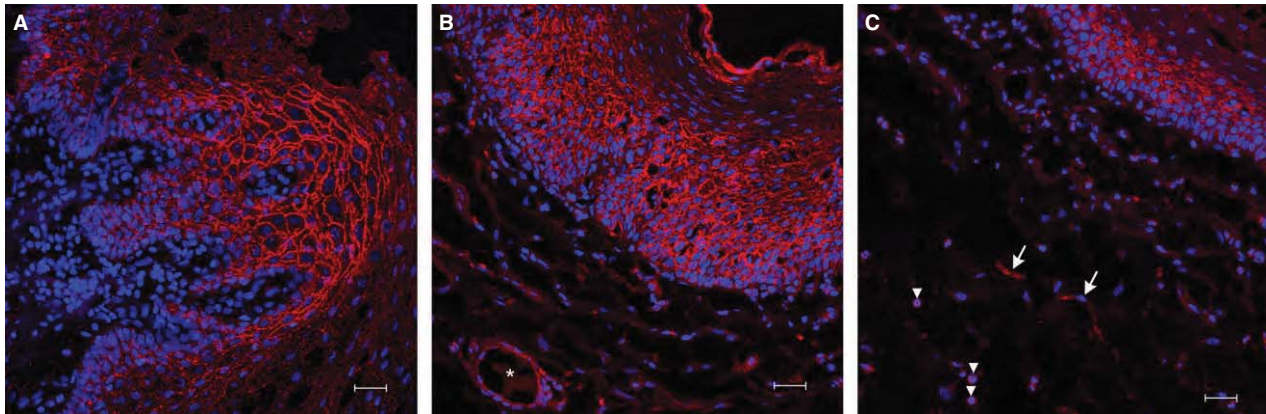


Figure 2 TRPV1 (red) immunoreactivity (IR) in fluorescent immunohistochemistry preparations with Hoechst staining of nuclei (blue) under confocal microscope. (A) Tongue mucosa and submucosa with TRPV1 IR on the membrane of epithelial cells from the basal layer of the epithelium; signal progressively fades in outer layers of the epithelium. (B) Pharynx mucosa and submucosa with intense TRPV1 IR on the membrane of epithelial cells from the basal layer of the epithelium; weaker TRPV1 IR is seen under the epithelium on blood vessel (asterisk) endothelial cells. (C) Epiglottis mucosa and submucosa with TRPV1 IR on the membrane of epithelial cells from the basal layer of the epithelium; TRPV1 IR can also be seen on polymorphonuclear leukocytes (arrowheads) and on a 4–5 μm thick fiber-like structure resembling an $\text{A}\delta$ nerve fiber (arrow). Images were obtained under 400 \times ; bars measure 30 μm .

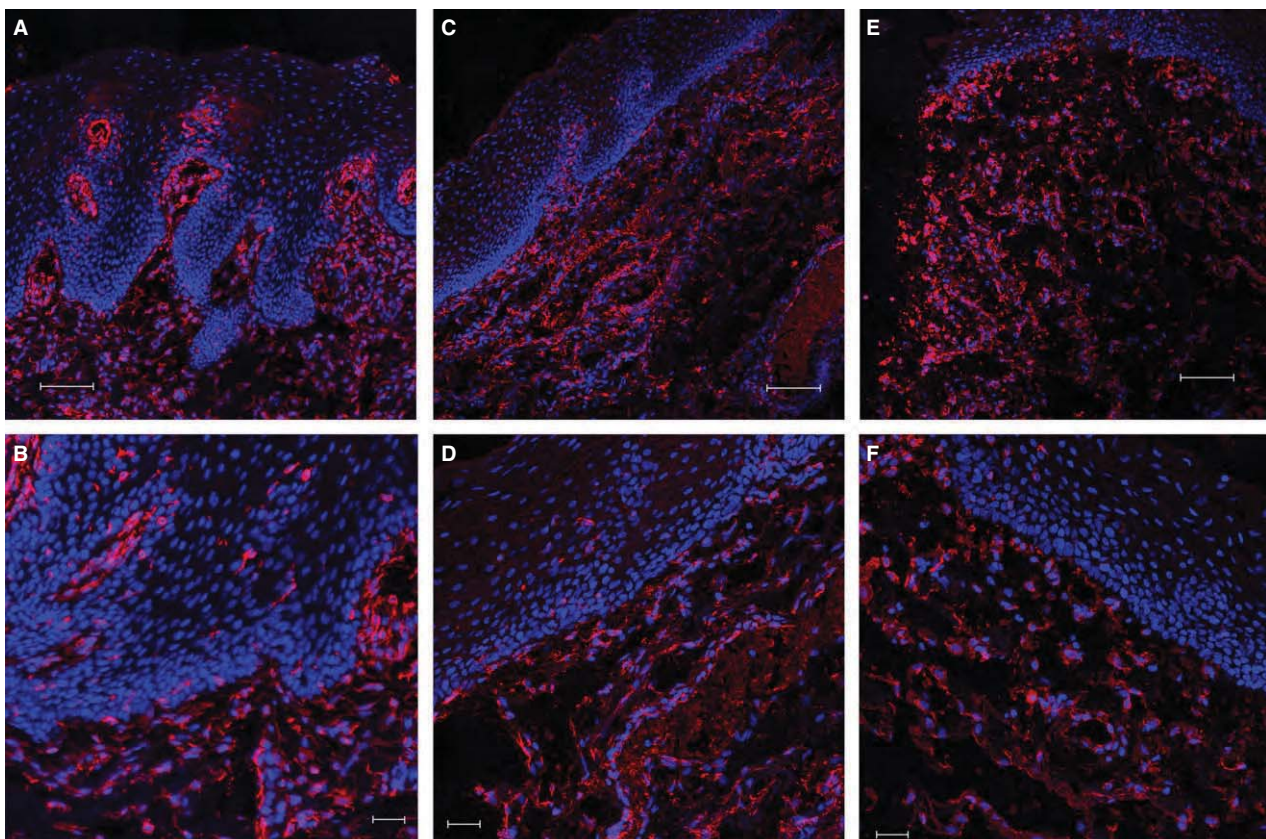


Figure 3 TRPA1 (red) immunoreactivity (IR) in fluorescent immunohistochemistry preparations with Hoechst staining of nuclei (blue) under confocal microscope. (A and B) Tongue mucosa and submucosa with TRPA1 IR on subepithelial elements, both between the filiform papillae and deeper into the submucosa. (C–F) Pharynx (C and D) and epiglottis (E and F) mucosa and submucosa with TRPA1 IR on scattered subepithelial elements. No signal is found on epithelial cells in any of the images. Images were obtained under 200 \times (top) or 400 \times (bottom). Bars measure 100 μm (top) or 30 μm (bottom).

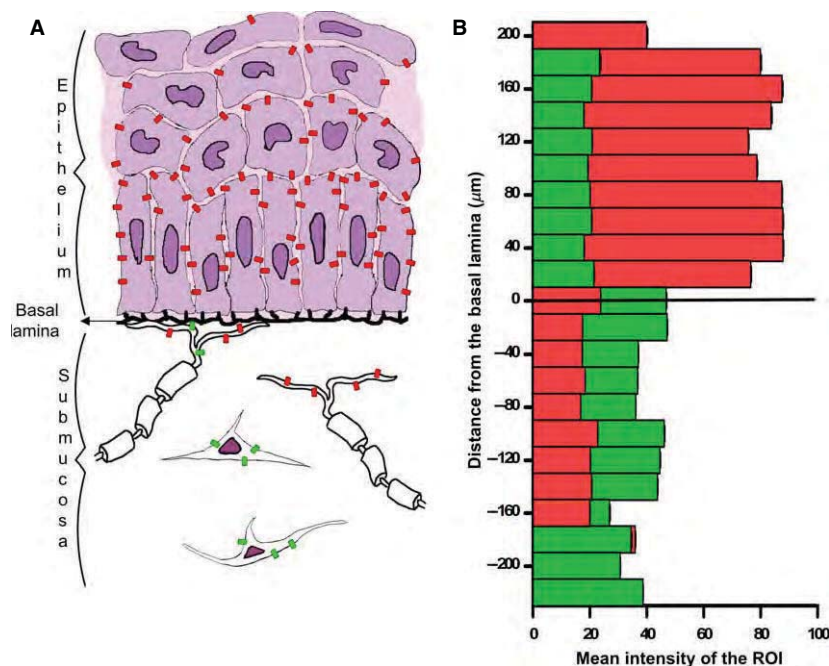


Figure 4 TRPV1 and TRPA1 distribution pattern. (A) Schematic drawing of the distribution pattern of TRPV1 (red) and TRPA1 (green) in the oropharynx. Nerves and fibroblasts are depicted in the submucosa. (B) Fluorescence intensity for TRPV1 (red) and TRPA1 (green) relative to the distance from the basal lamina of the epithelium of the oropharyngeal mucosa. Values of the X-axis correspond to the distance between the most superficial side of the ROI and the basal lamina. Positive values of the X-axis correspond to positions above the basal lamina (epithelium) and negative values correspond to positions below the basal lamina (submucosa). Intensity values are given as the mean of two correlative $10 \times 10 \mu\text{m}$ regions of interest (ROIs). The SEM of each bar is displayed. A straight line is drawn in the position 0 of the X-axis corresponding to the basal lamina.

by CN V (tongue), $20.97 \times 10^{-5} \pm 2.056 \times 10^{-5}$ in the region innervated by CN IX and X (faucial pillars and pharynx) and $16.59 \times 10^{-5} \pm 1.494 \times 10^{-5}$ in the region innervated by CN X (lingual surface of epiglottis), showing a significantly higher relative expression of TRPV1 to β -actin in the tongue than in the epiglottis ($p < 0.05$; Fig. 5A).

Quantitative mRNA TRPA1 analysis The relative expression of TRPA1 to β -actin was $2.736 \times 10^{-5} \pm 7.805 \times 10^{-6}$ in the region innervated by CN V (tongue), $1.493 \times 10^{-5} \pm 2.684 \times 10^{-6}$ in the region innervated by CN IX (faucial pillars), and $2.432 \times 10^{-5} \pm 7.970 \times 10^{-6}$ in the region innervated by CN X (lingual surface of epiglottis), without significant differences between these areas (Fig. 5A).

The TRPA1 relative expression was significantly lower than the TRPV1 relative expression in all the studied areas ($p < 0.001$; Fig. 5A). The relative expression of TRPV1 to TRPA1 was 38.44 ± 13.11 in the region innervated by CN V (tongue), 16.71 ± 3.24 in the region innervated by CN IX (faucial pillars) and 27.14 ± 9.52 in the region innervated by CN X (lingual surface of epiglottis), showing higher expression of TRPV1 in a consistent proportion in all areas (Fig. 5B). Nevertheless, it should be noted that the biopsies contained proportionally more epithelial cells expressing TRPV1 than the subepithelial elements expressing TRPA1, which could affect the comparative assessment.

DISCUSSION

Our results show that the TRPV1 and TRPA1 channels are expressed throughout the regions innervated by the cranial nerves V, IX, and X and are localized in two distinct patterns: TRPV1 is localized in epithelial cells and a few sensory fibers in the oropharyngeal submucosa, whereas TRPA1 is localized below the basal lamina but not in epithelial cells from the oropharynx.

The cranial nerves V, IX and X provide oropharyngeal chemosensation through free endings of their axons. Signals elicited by stimuli travel along these axons to the cell bodies located in the corresponding ganglia and then continue to the spinal nucleus of the trigeminal complex of the brainstem.³¹

Our results show how the oropharyngeal nerve fibers travel in bundles in deep layers of the submucosa, whereas the single axons reach the basal lamina and even contact the epithelial cells of the basal layer of the epithelium. However, no fibers were observed in the epithelium beyond the basal lamina. The presence of the free nerve endings in the epithelium has been debated in the literature. Some studies have shown the presence of free nerve endings in contact with the basal lamina³² and even penetrating it to reach superficial layers of the epithelium.³³ The nerve endings found in our study might be the ones responding to chemical, thermal, and noxious stimuli in the oropharynx.

Our results show the presence of TRPV1 on the epithelial cells of tongue, pharynx, and epiglottis and in the A δ fibers of the submucosa and TRPV1 expres-

TRPV1 and TRPA1 in the human oropharynx

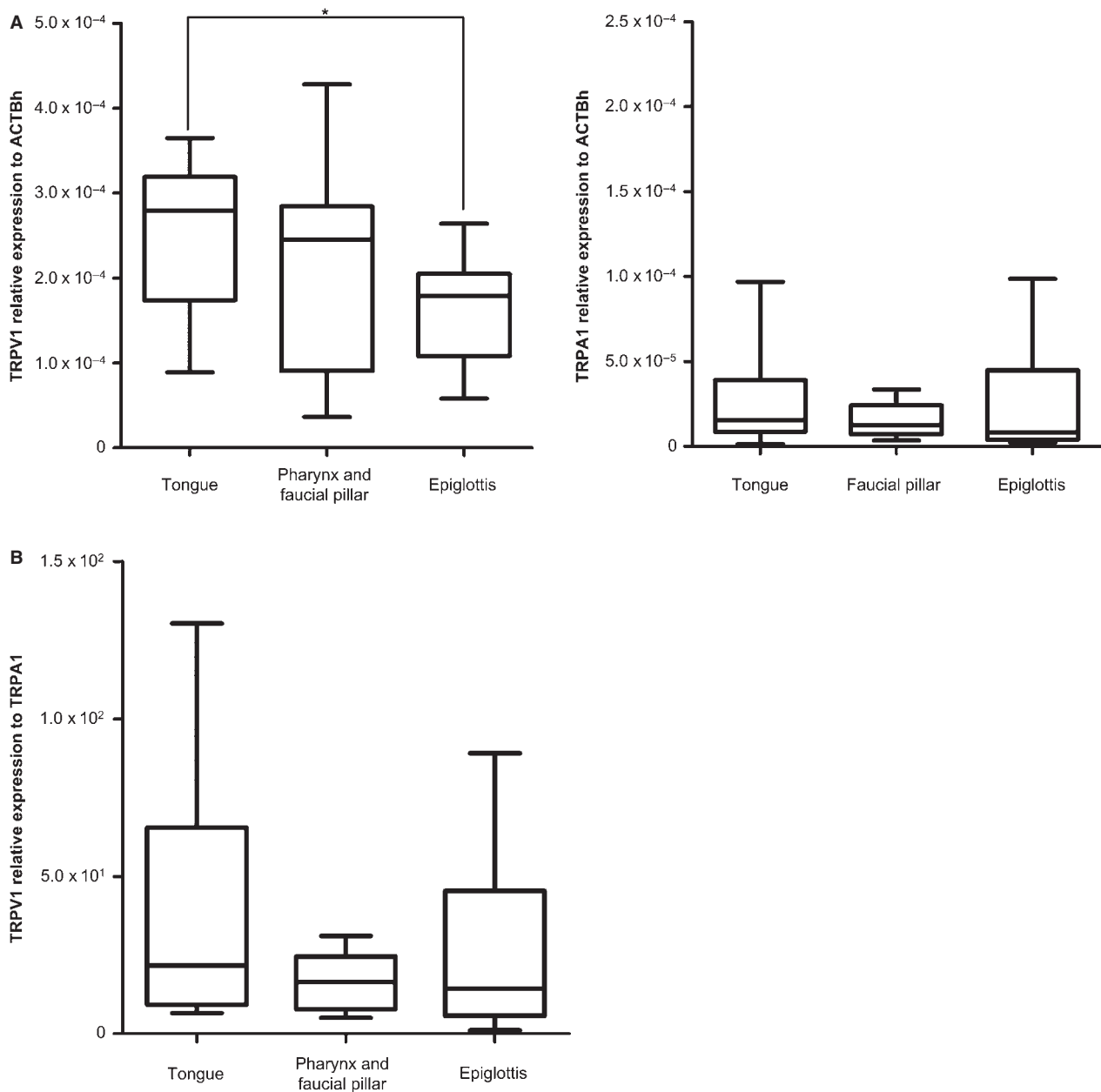


Figure 5 TRPV1 and TRPA1 expression analysis. (A) Relative expression of TRPV1 (right) and TRPA1 (left) to β -actin (ACTBh) in the areas innervated by the trigeminal (CN V), glossopharyngeal (CN IX) and vagus (CN X) nerves; * $p < 0.05$. (B) Relative expression of TRPV1 to TRPA1 in the areas innervated by the trigeminal (CN V), glossopharyngeal (CN IX) and vagus (CN X) nerves.

sion in the regions innervated by the cranial nerves V, IX, and X. Furthermore, the results show decreasing expression of TRPV1 the lower the studied region, with significantly different levels of expression between the tongue and epiglottis.

The TRPV1 expression has been thoroughly examined in murine models, providing evidence of its presence both at the epithelial cells and in afferent fibers throughout the oropharynx.^{34–36} However, there

is less information on TRPV1 expression and localization in the human oropharynx. Hou *et al.* found TRPV1 expression and immunoreactivity in human trigeminal ganglia neuronal cells and colocalization with CGRP and SP.³⁷ TRPV1 has been also localized in peripheral free nerve endings of the human larynx³⁸ and tongue.³⁹ Some studies have also found the expression and localization of TRPV1 in epithelial cells from the tongue^{39,40} where, as previously hypoth-

esized, it could trigger the release of inflammatory mediators that would interact with neuronal terminals and so amplify the signaling.⁴¹

From a functional point of view, it can be hypothesized that TRPV1 agonists, such as capsaicin, elicit their effect at both epithelial cells of the basal layer and afferent fibers in the submucosa. Capsaicin is a lipophilic molecule which permeates epithelial layers^{42,43} and so can travel through the epithelium and bind TRPV1 expressed by epithelial cells. This then activates Ca²⁺ inward currents in those cells which in turn activate the biosynthesis of endocannabinoids or other molecules known to modulate TRPV1^{44,45} and are synthesized in the epithelium⁴⁶; these endogenous agonists, along with the exogenous TRPV1 agonists, activate TRPV1 on the nerve fibers. Localized effect of capsaicin is, thus, amplified by the epithelium to elicit its pungent sensation through the afferent fibers of the submucosa.

Regarding TRPA1, our results show TRPA1 immunoreactivity on the surface of cells, presumably fibroblasts, below the basal lamina in all studied regions, but not in epithelial cells. We found that TRPA1 expression is similar in all the regions innervated by the cranial nerves V, IX, and X, and at considerably lower levels than the relative expression of TRPV1.

Bautista *et al.* described that the population of trigeminal ganglia neurons expressing TRPA1 represents 20% of small diameter axon neurons, all of which colocalized TRPA1 and TRPV1, whereas most of them also colocalized CGRP. They suggested that TRPA1 activates a subpopulation of peptidergic sensory neurons which are sensitive to capsaicin and produce peptidic inflammatory mediators.⁴⁷ As for peripheral localization of TRPA1, previous studies have also found evidence of the presence of TRPA1 on nerves in human tongue⁴⁸ and pharynx⁴⁹ and in epithelial cells and fibroblasts of human skin and bronchial epithelia.^{50,51} At these locations, it could be involved in inflammatory processes by stimulating the synthesis and release of cytokines such as interleukin 8.^{50–52}

As stated above, the lower TRPA1 expression relative to TRPV1 in the studied regions could be due to the fact that biopsies contain proportionally more epithelial cells expressing TRPV1 than subepithelial elements expressing TRPA1; further research should

be done to determine the difference of expression between TRPV1 and TRPA1 in peripheral tissues of the oropharynx.

Several studies have pointed out that oropharyngeal sensitivity is reduced in older people due to a decrease in myelinated sensory fibers.^{12,14,15} This study has not checked the effect of age on the expression of TRPV1 and TRPA1, but considers it would be of great interest to assess the effect of age on expression in future research.

In summary, this study confirms the presence of TRPV1 and TRPA1 in the regions where capsaicinoids and piperine were thought to elicit their pharmacological effect by enhancing afferent sensory inputs to the cortex and swallowing centers.^{20,21} The study presents two distinct patterns for the localization of TRPV1 and TRPA1: TRPV1 is found within epithelial cells of the oropharynx, whereas TRPA1 is found below the basal lamina. The anatomical and histological map of TRPV1 and TRPA1 expression may help to explain the way TRPV1 and TRPA1 respond to stimuli from both capsaicinoids and piperine and set the basis for future use of both agonists to treat OD. These studies should also consider the possible chemical desensitization of these receptors after continuous long-term exposure to high doses of the agonists.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the head of the Department of Pathology, Carme Admella, and the technicians Silvia García, Estibaliz Hinchada and Mari Pau Pérez for their assessment and assistance in histological procedures. They would also like to thank Mónica Roldán and Meritxell Vendrell for their assistance with the fluorescent IHC and the laser confocal microscope, Irene López for her assistance with the molecular biology procedures, and Marta Morell for assistance in sample processing. The authors thank Jane Lewis for writing assistance.

FUNDING

This study was supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (PS09/01012, INT 10/228), the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (14/00453, INT15/00026), the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (2009 SGR 708), and by the Fundació la Marató de TV3 (Project 112310).

DISCLOSURE

No competing interest declared.

REFERENCES

- 1 Serra-Prat M, Hinojosa G, Lopez D, Juan M, Fabre E, Voss DS, Calvo M, Marta V *et al.* Prevalence of oropharyngeal dysphagia and impaired safety and efficacy of swallow in independently living older persons. *J Am Geriatr Soc* 2011; **59**: 186–7.
- 2 Lin LC, Wu SC, Chen HS, Wang TG, Chen MY. Prevalence of impaired swallowing in institutionalized older people in Taiwan. *J Am Geriatr Soc* 2002; **50**: 1118–23.
- 3 Clave P, Shaker R. Dysphagia: current reality and scope of the problem. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015; **12**: 259–70.
- 4 Rofes L, Arreola V, Romea M, Palomera E, Almrall J, Cabré M, Serra-Prat M, Clavé P. Pathophysiology of oropharyngeal dysphagia in the frail elderly. *Neurogastroenterol Motil* 2010; **22**: 851–E230.
- 5 Serra-Prat M, Palomera M, Gomez C, Sar-Shalom D, Saiz A, Montoya JG, Navajas M, Palomera E *et al.* Oropharyngeal dysphagia as a risk factor for malnutrition and lower respiratory tract infection in independently living older persons: a population-based prospective study. *Age Ageing* 2012; **41**: 376–81.
- 6 Rofes L, Vilardell N, Clave P. Post-stroke dysphagia: progress at last. *Neurogastroenterol Motil* 2013; **25**: 278–82.
- 7 Martino R, Foley N, Bhogal S, Diamant N, Speechley M, Teasell R. Dysphagia after stroke - Incidence, diagnosis, and pulmonary complications. *Stroke* 2005; **36**: 2756–63.
- 8 Kalf JG, de Swart BJM, Bloem BR, Munneke M. Prevalence of oropharyngeal dysphagia in Parkinson's disease: a meta-analysis. *Parkinsonism Relat Disord* 2012; **18**: 311–5.
- 9 Langmore SE, Olney RK, Lomen-Hoerth C, Miller BL. Dysphagia in patients with frontotemporal lobar dementia. *Arch Neurol* 2007; **64**: 58–62.
- 10 Clave P, De Kraa M, Arreola V, Girvent M, Farré R, Palomera E, Serra-Prat M. The effect of bolus viscosity on swallowing function in neurogenic dysphagia. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; **24**: 1385–94.
- 11 Speyer R, Baijens L, Heijnen M, Zwijnenberg I. Effects of therapy in oropharyngeal dysphagia by speech and language therapists: a systematic review. *Dysphagia* 2010; **25**: 40–65.
- 12 Aviv JE. Effects of aging on sensitivity of the pharyngeal and supraglottic areas. *Am J Med* 1997; **103**: 74S–6S.
- 13 Aviv JE, Martin JH, Sacco RL, Zagar D, Diamond B, Keen MS, Blitzer A. Supraglottic and pharyngeal sensory abnormalities in stroke patients with dysphagia. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996; **105**: 92–7.
- 14 Mortelliti AJ, Malmgren LT, Gacek RR. Ultrastructural-changes with age in the human superior laryngeal nerve. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1990; **116**: 1062–9.
- 15 Tiago R, Pontes P, do Brasil OC. Age-related changes in human laryngeal nerves. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; **136**: 747–51.
- 16 Teismann IK, Steinstraeter O, Stoelckigt K, Suntrup S, Wollbrink A, Pantev C, Dziewas R. Functional oropharyngeal sensory disruption interferes with the cortical control of swallowing. *BMC Neurosci* 2007; **8**: 62.
- 17 Almirall J, Rofes L, Serra-Prat M, Icart R, Palomera E, Arreola V, Clavé P. Oropharyngeal dysphagia is a risk factor for community-acquired pneumonia in the elderly. *Eur Respir J* 2013; **41**: 923–8.
- 18 Teismann IK, Steinstraeter O, Warnecke T, Suntrup S, Ringelstein EB, Pantev C, Dziewas R. Tactile thermal oral stimulation increases the cortical representation of swallowing. *BMC Neurosci* 2009; **10**: 71.
- 19 Hamdy S, Aziz Q, Rothwell JC, Hobson A, Barlow J, Thompson DG. Cranial nerve modulation of human cortical swallowing motor pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1997; **272**: G802–8.
- 20 Rofes L, Arreola V, Martin A, Clave P. Natural capsaicinoids improve swallow response in older patients with oropharyngeal dysphagia. *Gut* 2013; **62**: 1280–7.
- 21 Rofes L, Arreola V, Martin A, Clave P. Effect of oral piperine on the swallow response of patients with oropharyngeal dysphagia. *J Gastroenterol* 2014; **49**: 1517–23.
- 22 Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; **389**: 816–24.
- 23 Cortright DN, Crandall M, Sanchez JF, Zou T, Krause JE, White G. The tissue distribution and functional characterization of human VR1. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **281**: 1183–9.
- 24 Ugawa S, Ueda T, Yamamura H, Nagao M, Shimada S. Coexpression of vanilloid receptor subtype-1 and acid-sensing ion channel genes in the human trigeminal ganglion neurons. *Chem Senses* 2005; **30**: 1195–1195.
- 25 Shabir S, Cross W, Kirkwood LA, Pearson JF, Appleby PA, Walker D, Eardley I, Southgate J. Functional expression of purinergic P2 receptors and transient receptor potential channels by the human urothelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; **305**: F396–406.
- 26 Denda M, Fuziwara S, Inoue K, Denda S, Akamatsu H, Tomitaka A, Matsunaga K. Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **285**: 1250–2.
- 27 Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC *et al.* ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 2003; **112**: 819–29.
- 28 Okumura Y, Narukawa M, Iwasaki Y, Ishikawa A, Matsuda H, Yoshikawa M, Watanabe T. Activation of TRPV1 and TRPA1 by black pepper components. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; **74**: 1068–72.
- 29 Karashima Y, Damann N, Prenen J, Talavera K, Segal A, Voets T, Nilius B. Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. *J Neurosci* 2007; **27**: 9874–84.
- 30 Mager SR, Oomen MHA, Morente MM, Ratcliffe C, Knox K, Kerr DJ, Pezzela F, Riegman PHJ. Standard operating procedure for the collection of fresh frozen tissue samples. *Eur J Cancer* 2007; **43**: 828–34.
- 31 Purve D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, White LE, eds. *Neuroscience*, 5th edn. Sunderland MA, USA: Sinauer Associates Inc, 2012.
- 32 Bengoechea Gonzalez ME, Alvarez Arenal A, Perez Casas A, Suarez Garnacho S, Vega Alvarez A, Villa Vigil A. Microscopic innervation and nerve receptors of the lingual mucosa. *Rev Eur Odontostomatol* 1989; **1**: 123–30.
- 33 Munger BL. Intraepidermal innervation of snout skin of opossum - a light and electron microscope study with observations on nature of Merckels Tastzellen. *J Cell Biol* 1965; **26**: 79–97.
- 34 Kido MA, Muroya H, Yamaza T, Terada Y, Tanaka T. Vanilloid recep-

- tor expression in the rat tongue and palate. *J Dent Res* 2003; **82**: 393–7.
- 35 Sasaki R, Sato T, Yajima T, Kano M, Suzuki T, Ichikawa H. The distribution of TRPV1 and TRPV2 in the rat pharynx. *Cell Mol Neurobiol* 2013; **33**: 707–14.
- 36 Kawashima M, Imura K, Sato I. Topographical organization of TRPV1-immunoreactive epithelium and CGRP-immunoreactive nerve terminals in rodent tongue. *Eur J Histochem* 2012; **56**: 129–34.
- 37 Hou MY, Uddman R, Tajti J, Kanje M, Edvinsson L. Capsaicin receptor immunoreactivity in the human trigeminal ganglion. *Neurosci Lett* 2002; **330**: 223–6.
- 38 Hamamoto T, Takumida M, Hirakawa K, Tatsukawa T, Ishibashi T. Localization of transient receptor potential vanilloid (TRPV) in the human larynx. *Acta Otolaryngol* 2009; **129**: 560–8.
- 39 Tachibana T, Chiba H. Relationship between glossodynia and capsaicin sensitive sensory neurons. *J Jpn Stomatol Soc* 2006; **55**: 167–78.
- 40 Marincsak R, Toth BI, Czifra G, Marton I, Redl P, Tar I, Toth L, Kovacs L. Increased expression of TRPV1 in squamous cell carcinoma of the human tongue. *Oral Dis* 2009; **15**: 328–35.
- 41 Southall MD, Li T, Gharibova LS, Pei Y, Nicol GD, Travers JB. Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; **304**: 217–22.
- 42 Pershing LK, Reilly CA, Corlett JL, Crouch DJ. Effects of vehicle on the uptake and elimination kinetics of capsaicinoids in human skin in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; **200**: 73–81.
- 43 Magnusson BM, Koskinen LOD. In vitro percutaneous penetration of topically applied capsaicin in relation to in vivo sensation responses. *Int J Pharm* 2000; **195**: 55–62.
- 44 Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang HH, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 1999; **400**: 452–7.
- 45 Ahluwalia J, Urban L, Bevan S, Nagy I. Anandamide regulates neuropeptide release from capsaicin-sensitive primary sensory neurons by activating both the cannabinoid 1 receptor and the vanilloid receptor 1 in vitro. *Eur J Neurosci* 2003; **17**: 2611–8.
- 46 Maccarrone M, Di Rienzo M, Battista N, Gasperi V, Guerrieri P, Rossi A, Finazzi-Agro A. The endocannabinoid system in human keratinocytes - Evidence that anandamide inhibits epidermal differentiation through CB1 receptor dependent inhibition of protein kinase C, activating protein-1, and transglutaminase. *J Biol Chem* 2003; **278**: 33896–903.
- 47 Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Hogestatt ED, Julius D, Jordt SE *et al.* Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 12248–52.
- 48 Morgan CR, Bird EV, Robinson PP, Boissonade FM. TRPA1 expression in human lingual nerve neuromas in patients with and without symptoms of dysaesthesia. *Neurosci Lett* 2009; **465**: 189–93.
- 49 des Gachons CP, Uchida K, Bryant B, Shima A, Sperry JB, Dankulich-Nagrudny L, Tominaga M, Smith AB *et al.* Unusual pungency from extra-virgin olive oil is attributable to restricted spatial expression of the receptor of oleocanthal. *J Neurosci* 2011; **31**: 999–1009.
- 50 Atoyán R, Shander D, Botchkareva NV. Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin. *J Invest Dermatol* 2009; **129**: 2312–5.
- 51 Mukhopadhyay I, Gomes P, Aranake S, Shetty M, Karnik P, Damle M, Kuruganti S, Thorat S. Expression of functional TRPA1 receptor on human lung fibroblast and epithelial cells. *J Recept Signal Transduction* 2011; **31**: 350–8.
- 52 Biro T, Kovacs L. An, “ice-cold” TR(i)P to skin biology: the role of TRPA1 in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2009; **129**: 2096–9.

Research Article

Pharmacodynamics of TRPV1 Agonists in a Bioassay Using Human PC-3 Cells

Daniel Alvarez-Berdugo,¹ Marcel Jiménez,^{2,3} Pere Clavé,^{1,2} and Laia Rofes²

¹ *Laboratori de Fisiologia Digestiva, Departament de Cirurgia, Hospital de Mataró, Universitat Autònoma de Barcelona, 08304 Mataró, Spain*

² *Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, 28029 Madrid, Spain*

³ *Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Bellaterra, Spain*

Correspondence should be addressed to Pere Clavé; pere.clave@ciberehd.org

Received 19 August 2013; Accepted 5 December 2013; Published 2 February 2014

Academic Editors: J.-T. Cheng and E. Hopper-Borge

Copyright © 2014 Daniel Alvarez-Berdugo et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Purpose. TRPV1 is a multimodal channel mainly expressed in sensory neurons. We aimed to explore the pharmacodynamics of the TRPV1 agonists, capsaicin, natural capsaicinoids, and piperine in an *in vitro* bioassay using human PC-3 cells and to examine desensitization and the effect of the specific antagonist SB366791. **Methods.** PC-3 cells expressing TRPV1 were incubated with Fluo-4. Fluorescence emission changes following exposition to agonists with and without preincubation with antagonists were assessed and referred to maximal fluorescence following the addition of ionomycin. Concentration-response curves were fitted to the Hill equation. **Results.** Capsaicin and piperine had similar pharmacodynamics (E_{\max} 204.8 ± 184.3% piperine versus 176.6 ± 35.83% capsaicin, $P = 0.8814$, Hill coefficient 0.70 ± 0.50 piperine versus 1.59 ± 0.86 capsaicin, $P = 0.3752$). In contrast, capsaicinoids had lower E_{\max} (40.99 ± 6.14% capsaicinoids versus 176.6 ± 35.83% capsaicin, $P < 0.001$). All the TRPV1 agonists showed significant desensitization after the second exposition and their effects were strongly inhibited by SB366791. **Conclusion.** TRPV1 receptor is successfully stimulated by capsaicin, piperine, and natural capsaicinoids. These agonists present desensitization and their effect is significantly reduced by a TRPV1-specific antagonist. In addition, PC-3 cell bioassays proved useful in the study of TRPV1 pharmacodynamics.

1. Introduction

The transient receptor potential family V member 1 cation channel (TRPV1) is a nonselective channel that responds to noxious stimuli such as low pH, painful heat, and irritants. Identification of TRPV1 through molecular cloning such as the capsaicin receptor [1] represented a milestone in the study of noxious stimuli. Since then, many studies have tried to determine its druggability and pharmacological characterization [2–4].

TRPV1 is mainly expressed in unmyelinated C fibers and in A δ thinly myelinated fibers of the dorsal root (DRG), trigeminal ganglion (TG), and visceral afferent fibers and it plays an important role in temperature and pain perception. However, TRPV1 expression is not exclusive to neuronal tissue but can be found in other locations such as urothelial and epithelial cells [5, 6], which respond first to irritating

and inflammatory stimuli together with afferent nociceptors [7, 8].

Upregulation of TRPV1 expression has been observed in various diseases [9] including those associated with visceral hypersensitivity such as irritable bowel syndrome [10] and other diseases like chronic cough [11] and neuropathic pain [12]. Downregulation of TRPV1 has been observed in some diseases such as periodontitis [13]. Strategies aiming to block or desensitize TRPV1 have been explored to treat several diseases such as neuropathic pain, spinal detrusor hyperreflexia, bladder hypersensitivity, and pruritus [3]. Hence, TRPV1 agonists and antagonists have become essential pharmacological tools to address the treatment of these disorders.

Most bioassays aiming to characterize the pharmacodynamics of these TRPV1 ligands use human cells such as HEK293 heterologously expressing TRPV1 [14]. However, this technology is not available for most research groups

and has some limitations in studies concerning excitable receptors due to the differences between the original cell and the engineered one [15]. There are also problems derived from the heterologous expression technique such as insertional alterations. Recently, Sánchez et al. [16] demonstrated the natural expression of TRPV1 in two human prostate cell cultures: PC-3 and LNCaP. They did this by means of retrotranscription polymerase chain reaction (RT-PCR), Western Blot, and binding studies. Thus, PC-3 was shown to be a human prostate epithelial cancer cell line that could be used to examine TRPV family receptors pharmacodynamics in future studies.

The aim of the present study was to explore the pharmacodynamics of TRPV1 agonists (capsaicin, natural capsaicinoids, and piperine) in a bioassay using human PC-3 cells prior to performing a clinical study.

2. Material and Methods

2.1. Experimental Design. In this bioassay, we compared the pharmacodynamics of capsaicin, natural capsaicinoids, and piperine and studied the effect of desensitization after repeated exposure and the effect of the specific TRPV1 antagonist, SB366791.

2.2. Cell Culture and Calcium Imaging. Human Caucasian prostate adenocarcinoma PC-3 cells expressing TRPV1 (ECACC Catalogue no. 90112714, Salisbury, UK) were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 UI/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin, and 0.25 µg/mL amphotericin B (all from Invitrogen, Paisley, UK) at 37°C and 5% CO₂. Cells were passed every 3-4 days and only cells from passage 25 or lower were used in the study. Twenty-four hours before the experiment, cells were passed to a 35 mm plate with a glass cover slip. Before the assay, cells were incubated with extracellular medium (140 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1 mM MgCl₂·6H₂O, 1.8 mM CaCl₂·2H₂O, 10 mM glucose, and 10 mM HEPES; pH 7) containing 3.64 µM of Fluo-4 AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) at room temperature for 45 min. Cover slips were then mounted in an imaging chamber and continuously perfused with the extracellular medium. The cells were imaged with IX-FLA equipment (Olympus Biosystems, Heidelberg, Germany) connected to an Olympus IX70 microscope with a 20x lens. The timing of the experiments consisted of 10 s agonist expositions, 5 min antagonist incubations, and 10 min of interexposition periods. Ionomycin (10 µM) was added at the end of each experiment as a control of fluorescence. Images were recorded for 40 s at 2.5 Hz, and fluorescence emission changes were measured after each agonist addition at 488 nm.

2.3. Drugs and Reagents. Capsaicin, SB366791 (both from Tocris, Bristol, UK), piperine, and ionomycin (from Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) 1 mM. Final concentrations were obtained by dissolution of drugs in extracellular medium. Capsaicinoid concentration in capsaicinoid sauce (McIlhenny Co, Avery Island, LA, USA) was determined using liquid chromatography (AOAC 995.03) and was 185.5 µg/g, the final desired

concentration being obtained by dissolution in extracellular medium.

2.4. Data Analysis. The analysis was performed with the Cell software (Olympus Biosystems, Heidelberg, Germany). Fluorescence from individual cells was monitored as a function of time by drawing a region surrounding the inner part of the cell membrane, the region of interest (ROI), and measuring the total fluorescent signal from this region. A total of 10 ROI were selected from each plate. Maximum intensity of fluorescence (F_{max}) was measured at the end of the experiment following the application of the Ca²⁺ ionophore, ionomycin (1 µM). Background fluorescence was determined by measuring the fluorescent signal of a ROI without a cell and was subtracted from the increases in cell fluorescence (ΔF). These were calculated as the mean of the peak fluorescence value and the fluorescence value of 2 frames before and 2 frames after the peak, minus the basal fluorescence at the onset of the recording (the mean fluorescence value over the 10 first frames) (Figure 1). All experiments were carried out at room temperature (18–20°C).

2.5. Statistical Methods. Concentration-response curves were fitted to the Hill equation. Variables in the equation are shown as mean \pm SEM and contrasted by means of a Student *t*-test for nonpaired data. The nonparametric Mann-Whitney *U* test was used to analyze desensitization and antagonism. Statistical significance was accepted if *P* values were less than 0.05. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.01 (San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Pharmacodynamics of TRPV1 Agonists. Capsaicin, the reference agonist of TRPV1, and piperine caused a concentration-dependent response in PC-3 cells, achieving maximal effect at 10⁻⁵ and 10⁻³ M, respectively, with similar E_{max} (204.8 \pm 184.3% piperine versus 176.6 \pm 35.83% capsaicin, *P* = 0.8814) and Hill coefficient (0.70 \pm 0.50 piperine versus 1.59 \pm 0.86 capsaicin, *P* = 0.3752) and not significantly different EC₅₀ (4.14 · 10⁻⁴ M piperine versus 1.90 · 10⁻⁶ M capsaicin, *P* = 0.0675). Natural capsaicinoids also caused a concentration-dependent intracellular calcium increase, with significantly lower E_{max} than capsaicin (40.99 \pm 6.14% capsaicinoids versus 176.6 \pm 35.83% capsaicin, *P* < 0.001), and similar EC₅₀ (4.36 · 10⁻⁶ M capsaicinoids versus 1.90 · 10⁻⁶ M capsaicin, *P* = 0.1601) and Hill coefficient (1.18 \pm 0.45 capsaicinoids versus 1.59 \pm 0.86 capsaicin, *P* = 0.674) (Figure 2).

3.2. Specificity: Desensitization and the Effect of an Antagonist. Repetitive expositions to capsaicin (10⁻⁶ M, 10 min interexposition), piperine (10⁻³ M and 10⁻⁴ M, 10 min interexposition), or natural capsaicinoids 1.2 · 10⁻⁵ M (10 min interexposition) significantly reduced the response of PC-3 cells. The effect of capsaicin was reduced by 38.31 \pm 4.08%, piperine by 67.61 \pm 5.31%, and capsaicinoids by 22.30 \pm 2.24% after second exposition (Figure 3). In addition, 5 min incubation with the specific TRPV1 antagonist SB366791 (10⁻⁵ M), strongly

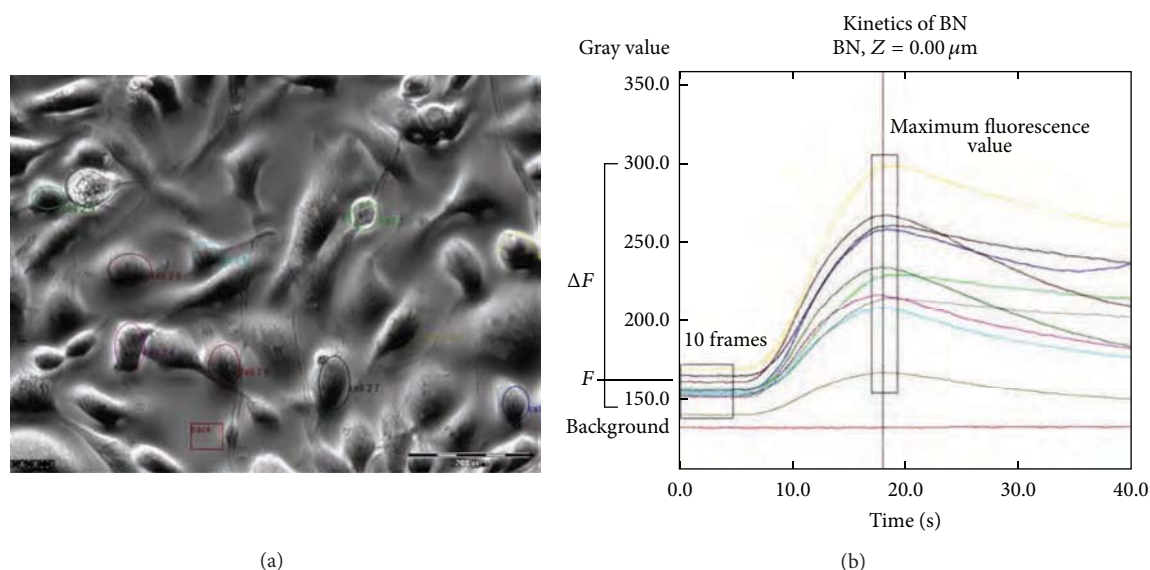


FIGURE 1: Calcium imaging data analysis. The regions of interest (ROIs) of 10 cells per plate (colored ellipsis) are marked to measure changes in fluorescence and a ROI without cells (dark red rectangle) is also marked to measure the background signal (a). Increases in fluorescence are plotted as a time function for each cell. The increase of fluorescence (ΔF) is calculated as the difference between the mean of the peak and 2 frames backward and forward (narrow rectangle measurements) and the mean of the measurements of 10 frames before agonist exposition (wide rectangle of measurements); the background signal (red line) is then subtracted (b).

antagonized the response of capsaicin (10^{-6} M), piperine (10^{-3} M), and capsaicinoids ($1.2 \cdot 10^{-5}$ M). Following 5 min incubation with the antagonist and 5 min wash before second exposition, the effect of capsaicin was reduced by $74.66 \pm 2.93\%$; piperine by $100 \pm 0.005\%$, and capsaicinoids by $91.71 \pm 2.76\%$ (Figure 3).

4. Discussion

The results show that capsaicin and piperine to a greater degree and natural capsaicinoids to a lesser degree successfully stimulate the TRPV1 channel. Repeated exposition of these agonists decreases the effect on TRPV1, suggesting desensitization. Moreover, their effect is significantly reduced by a TRPV1-specific antagonist, showing their action to be specific to this receptor. PC-3 cells were found to be perfectly adequate tools to study TRPV1 pharmacodynamics.

Caterina et al. studied the pharmacology of rVR1 when they first cloned it [1]. Since then, several groups have evaluated the use of TRPV1 as a therapeutic target to treat various diseases [3, 4]. In our research, TRPV1 is a promising target to treat oropharyngeal dysphagia, a major complaint among the elderly and patients with neurological diseases, and one characterized by pharyngeal and laryngeal sensory deficits and delayed and prolonged swallow response [17]. Previous clinical studies showed capsaicin and piperine to be effective in improving the swallowing response [18, 19] but we needed more knowledge of the TRPV1 agonists' pharmacodynamics to design a clinical trial to assess proof of concept [20]. We used a bioassay to evaluate the pharmacology of capsaicin, piperine, and natural capsaicinoids on human TRPV1 constitutively expressed in PC-3 cells.

In our study, capsaicin and piperine had similar E_{\max} and Hill coefficient values and we did not find significant differences in their EC_{50} values, while comparable assays found a lower maximum effect for piperine and significant differences in their EC_{50} [21, 22]. We also found that natural capsaicinoid sauce has lower E_{\max} than capsaicin or piperine. This could be explained by the fact that capsaicinoid sauce contains different capsaicinoids, one of which is capsaicin, found in previous studies to have the greatest pungent effect among vanilloids [23]. Our results helped us determine the following optimal concentrations for the clinical trial: $10 \mu\text{M}$ for capsaicin, $150 \mu\text{M}$ to 1mM for piperine, and $150 \mu\text{M}$ for capsaicinoid sauce [20].

Our results also showed that all the agonists tested undergo desensitization after repeated exposition. Capsaicin had already been shown to desensitize TRPV1 action [1, 21, 24], and Liu and Simon had shown that piperine also desensitizes TRPV1 action [21], but in our assay piperine desensitized TRPV1 action to a greater degree.

Finally, the use of TRPV1-specific antagonist SB-366791 allowed us to verify that the effect of our agonists is specific to TRPV1. In previous studies, capsazepine was used as a specific vanilloid receptor antagonist to assess agonist specificity, but it has nonselective actions on other receptors and apparent modality-specific properties. SB-366791, however, is a TRPV1 antagonist with high potency and improved selectivity profile with respect to other commonly used TRPV1 antagonists [25]. Another difference between our study and previous ones is the assay design with PC-3 cells, a system that has been rarely used in comparison with transfected HEK293 cells. This study shows that PC-3 cells are a good surrogate to test TRPV1 pharmacology and more accessible as they do not require transfection.

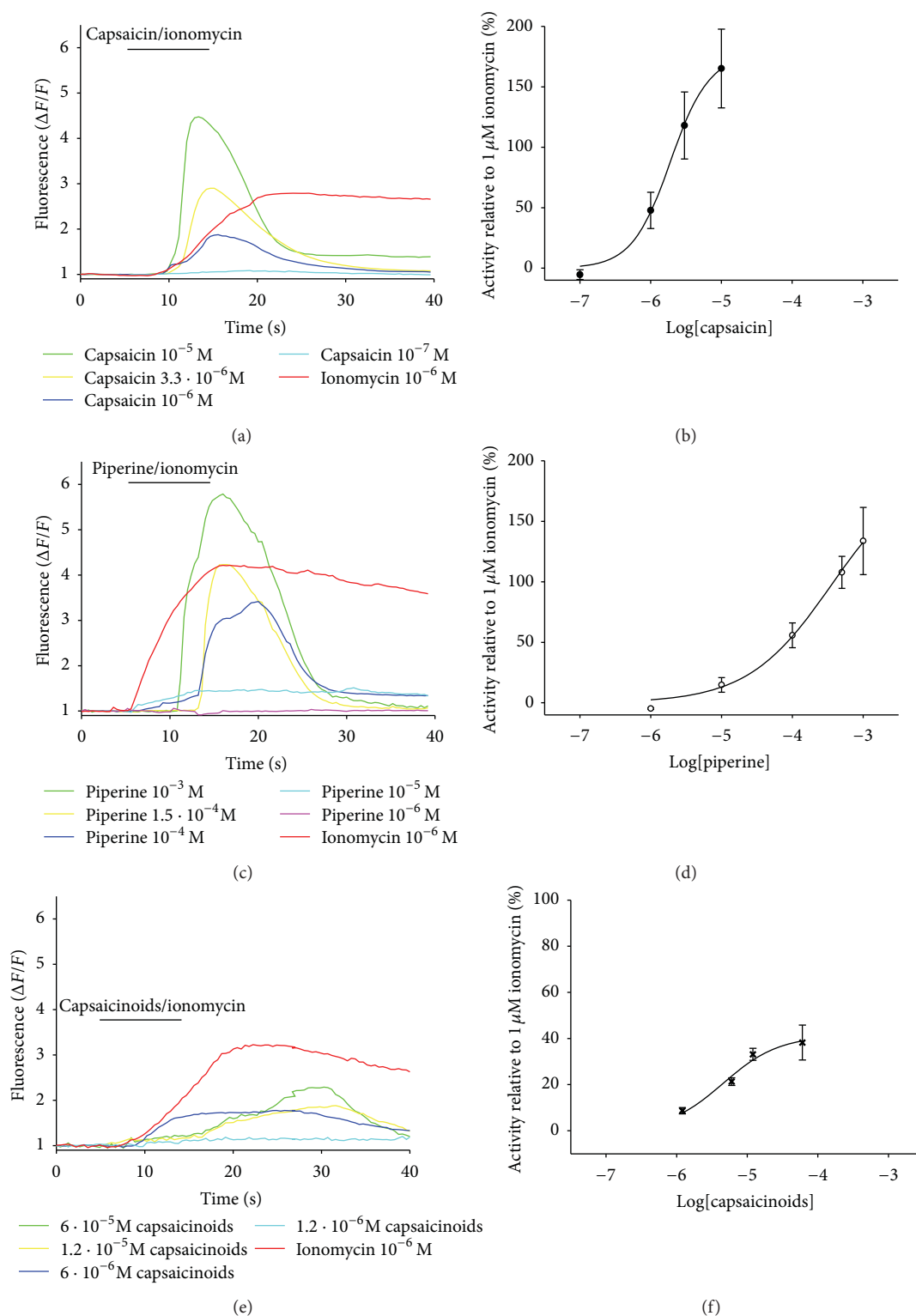


FIGURE 2: Calcium transients and dose-response curves. The means of measurements for each agonist concentration are plotted as time functions of the increase in fluorescence related to the signal before exposition (a, c, and e); ionomycin was applied at the end of each experiment and its maximum effect was used to normalize the effect of the different agonists and concentrations. The slope showing calcium entrance induced by capsaicin and piperine exposition (capsaicin 830.1 ± 128.1 relative increase of fluorescence per second and piperine 1238 ± 146.8 relative increase of fluorescence per second) (a, c) is sharper than the slope showing calcium entrance induced by natural capsaicinoids exposition (184.6 ± 17.39 relative increase of fluorescence per second) (e). The normalized effect of each concentration is plotted as a dose-response curve for each agonist. Each point represents the mean \pm SEM of 3 independent experiments ($n = 10$) (b, d, and f).

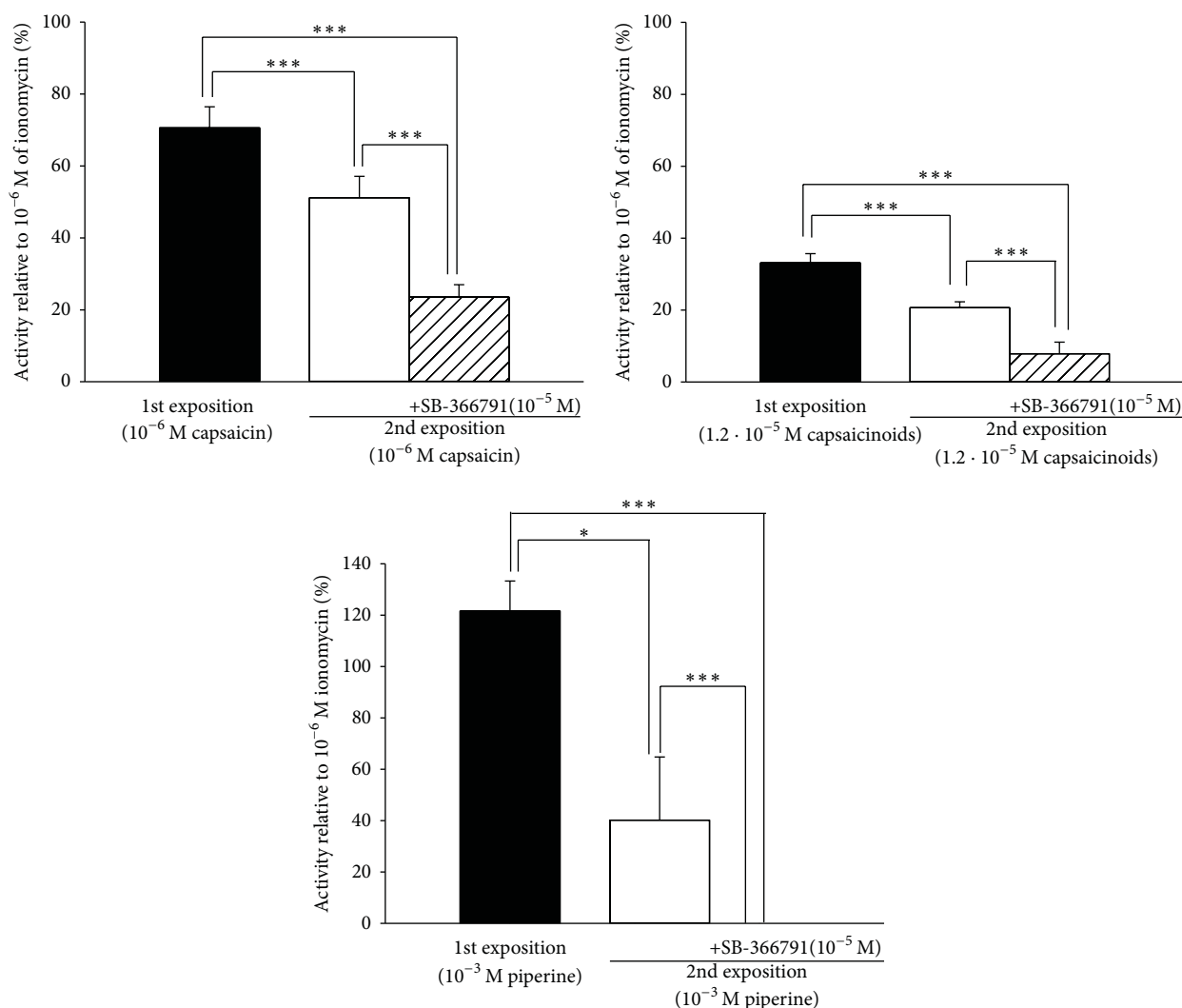


FIGURE 3: Desensitization and antagonist effect. Capsaicin, capsaicinoids, and piperine normalized first exposition effect (black box) is compared with their normalized second exposition effect (white box) and SB-366791 incubation before second exposition effect (striped box). Data is expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

5. Conclusion

In summary, we have examined the pharmacological parameters of TRPV1 agonists and analysed desensitization and the effect of the antagonist SB366791 using an alternative methodology more easily accessible to most research groups. We reached our goal of testing capsaicin, piperine, and natural capsaicinoid pharmacodynamics for subsequent clinical assays.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (PS09/01012, INT 10/228),

the Generalitat de Catalunya (2011 CTP 00032), the Agencia de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (2009 SGR 708), and La Fundació Marató de TV3. The authors thank N. Olea and I. Díaz-Laviada from Universidad de Alcalá de Henares for generously supplying PC-3 cells and Bolton Cile (especially A de la Cruz) for kindly providing the capsaicinoids sauce. They would also like to thank C. Arenas and E. Martínez for their helpful collaboration in the present study and J. Lewis for writing assistance.

References

- [1] M. J. Caterina, M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine, and D. Julius, "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway," *Nature*, vol. 389, no. 6653, pp. 816–824, 1997.
- [2] A. Ferrer-Montiel, C. García-Martínez, C. Morenilla-Palao et al., "Molecular architecture of the vanilloid receptor: insights for drug design," *European Journal of Biochemistry*, vol. 271, no. 10, pp. 1820–1826, 2004.

- [3] A. Szallasi and P. M. Blumberg, "Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms," *Pharmacological Reviews*, vol. 51, no. 2, pp. 159–211, 1999.
- [4] O. Sterner and A. Szallasi, "Novel natural vanilloid receptor agonists: new therapeutic targets for drug development," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 20, no. 11, pp. 459–465, 1999.
- [5] A. Avelino, C. Cruz, I. Nagy, and F. Cruz, "Vanilloid receptor 1 expression in the rat urinary tract," *Neuroscience*, vol. 109, no. 4, pp. 787–798, 2002.
- [6] K. Inoue, S. Koizumi, S. Fuziwara, S. Denda, K. Inoue, and M. Denda, "Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 291, no. 1, pp. 124–129, 2002.
- [7] M. J. Caterina, "Vanilloid receptors take a TRP beyond the sensory afferent," *Pain*, vol. 105, no. 1-2, pp. 5–9, 2003.
- [8] M. D. Southall, T. Li, L. S. Gharibova, Y. Pei, G. D. Nicol, and J. B. Travers, "Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 304, no. 1, pp. 217–222, 2003.
- [9] A. Szallasi, "Vanilloid (capsaicin) receptors in health and disease," *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 118, no. 1, pp. 110–121, 2002.
- [10] A. Akbar, Y. Yiangou, P. Facer, J. R. F. Walters, P. Anand, and S. Ghosh, "Increased capsaicin receptor TRPV1-expressing sensory fibres in irritable bowel syndrome and their correlation with abdominal pain," *Gut*, vol. 57, no. 7, pp. 923–929, 2008.
- [11] D. A. Groneberg, A. Niimi, Q. T. Dinh et al., "Increased expression of transient receptor potential vanilloid-1 in airway nerves of chronic cough," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 170, no. 12, pp. 1276–1280, 2004.
- [12] H. Urano, T. Ara, and Y. Fujinami, "Aberrant TRPV1 expression in heat hyperalgesia associated with trigeminal neuropathic pain," *Journal of Pharmacological Sciences*, vol. 118, pp. 690–697, 2012.
- [13] A. Öztürk and L. Yildiz, "Expression of transient receptor potential vanilloid receptor 1 and toll-like receptor 4 in aggressive periodontitis and in chronic periodontitis," *Journal of Periodontal Research*, vol. 46, no. 4, pp. 475–482, 2011.
- [14] M. Tominaga, M. J. Caterina, A. B. Malmberg et al., "The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli," *Neuron*, vol. 21, no. 3, pp. 531–543, 1998.
- [15] H. A. Lester, "Heterologous expression of excitability proteins: route to more specific drugs?" *Science*, vol. 241, no. 4869, pp. 1057–1063, 1988.
- [16] M. G. Sánchez, A. M. Sánchez, B. Collado et al., "Expression of the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) in LNCaP and PC-3 prostate cancer cells and in human prostate tissue," *European Journal of Pharmacology*, vol. 515, no. 1–3, pp. 20–27, 2005.
- [17] P. Clavé, R. Terré, M. de Kraa, and M. Serra, "Approaching oropharyngeal dysphagia," *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, vol. 96, no. 2, pp. 119–131, 2004.
- [18] T. Ebihara, H. Takahashi, S. Ebihara et al., "Capsaicin troche for swallowing dysfunction in older people," *Journal of the American Geriatrics Society*, vol. 53, no. 5, pp. 824–828, 2005.
- [19] T. Ebihara, S. Ebihara, M. Maruyama et al., "A randomized trial of olfactory stimulation using black pepper oil in older people with swallowing dysfunction," *Journal of the American Geriatrics Society*, vol. 54, no. 9, pp. 1401–1406, 2006.
- [20] L. Rofes, V. Arreola, A. Martin, and P. Clave, "Natural capsaicinoids improve swallow response in older patients with oropharyngeal dysphagia," *Gut*, vol. 62, no. 9, pp. 1280–1287, 2013.
- [21] L. Liu and S. A. Simon, "Similarities and differences in the currents activated by capsaicin, piperine, and zingerone in rat trigeminal ganglion cells," *Journal of Neurophysiology*, vol. 76, no. 3, pp. 1858–1869, 1996.
- [22] Y. Okumura, M. Narukawa, Y. Iwasaki et al., "Activation of TRPV1 and TRPA1 by black pepper components," *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 74, no. 5, pp. 1068–1072, 2010.
- [23] D. Ursu, K. Knopp, R. E. Beattie, B. Liu, and E. Sher, "Pungency of TRPV1 agonists is directly correlated with kinetics of receptor activation and lipophilicity," *European Journal of Pharmacology*, vol. 641, no. 2-3, pp. 114–122, 2010.
- [24] P. Hayes, H. J. Meadows, M. J. Gunthorpe et al., "Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1," *Pain*, vol. 88, no. 2, pp. 205–215, 2000.
- [25] M. J. Gunthorpe, H. K. Rami, J. C. Jerman et al., "Identification and characterisation of SB-366791, a potent and selective vanilloid receptor (VR1/TRPV1) antagonist," *Neuropharmacology*, vol. 46, no. 1, pp. 133–149, 2004.