



Índice

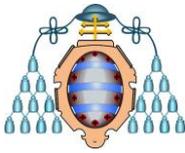
1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	6
3. Estado actual del problema.....	8
3.1 Inervación de la faringe humana.....	8
3.1.1 Inervación macroscópica de la faringe	
3.1.2 Inervación sensitiva microscópica de la faringe	
3.1.2.1 Inervación sensitiva general	
3.2 Principales reflejos faríngeos en el hombre.....	9
3.2.1 Respuestas reflejas simples	
3.2.1.1 Protección de la faringe y vías respiratorias altas	
3.2.1.2 Reflejos respiratorios	
3.2.1.3 Reflejos cardiovasculares	
3.2.2 Respuestas reflejas complejas	
3.2.2.1 Respiración oral	
3.2.2.2 Mantenimiento de la permeabilidad faríngea	
3.2.2.3 Transporte y protección de la faringe	
3.3 Bases moleculares de la mecanosensibilidad.....	15
3.3.1 Introducción	
3.3.2 Canales iónicos relacionados con la mecanotransducción	
3.3.2.1 Degenerinas/canales epiteliales de Na ⁺ (DEG/ENAC)	
3.3.2.2 Canales iónicos sensibles al ácido (ASICs)	
3.3.2.3 Canales iónicos de la superfamilia TRP	
4. Objetivos.....	20
5. Material y técnicas.....	21
5.1 Material	
5.2 Técnicas	
5.2.1 Inmunohistoquímica simple	
5.2.2 Inmunohistoquímica doble	
6. Resultados.....	25
6.1 Organización de los nervios y formaciones nerviosas...	



6.2 Formaciones espiroideas en los músculos de la faringe	
6.3 Distribución de las mecanoproteínas TRP y ASIC	
7. Discusión.....	33
8. Conclusiones.....	38
9. Bibliografía.....	39

Índice de Tablas

Tabla 1.	
Anticuerpos primarios usados en el estudio.....	24



Índice de Ilustraciones

Figura 1.

Diferentes morfotipos de formaciones nerviosas sensitivas, de tipo corpuscular en los músculos de la faringe. Enolasa neuronal específica. Magnificación original x20.....25

Figura 2.

Diferentes morfotipos de formaciones corpusculares en los músculos de la faringe. Las redondeadas pueden asimilarse a corpúsculos sensitivos de tipo Ruffini-like. Enolasa neuronal específica. Magnificación original x20 (izquierda) y x40 (derecha).....26

Figura 3.

Diferentes morfotipos de formaciones corpusculares e los músculos de la faringe. Proteína S100. Magnificación original x20 (izquierda) y x40 (derecha).....27

Figura 4.

Formaciones nerviosas espiroideas inmunoreactivas para la enolasa neuronal específica y las situadas en los septos conectivos de los músculos de la faringe. Enolasa neuronal específica. Magnificación original x20 (imágenes superior a inferior) y x40 (imagen central).....28

Figura 5.

Formaciones nerviosas espiroideas inmunoreactivas para la enolasa neuronal específica (rojo) y la proteína S100 (verde) situadas en los septos conectivos de los músculos de la faringe. La fluorescencia azul corresponde al DAPI, utilizado para marcar los núcleos celulares.....29

Figura 6.

Localización inmunohistoquímica de TRPV4 en la faringe humana. El patrón de inmunomarcaje es compatible con localización en los nervios sensitivos de la faringe. Magnificación original x20 (derecha) y x40 (izquierda).....30

Figura 7.

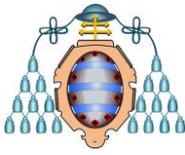
Localización inmunohistoquímica de TRPA1 (imágenes izquierda y central) y TRPC6 (imagen derecha) en la faringe humana. El inmunomarcaje se localiza exclusivamente en las glándulas de la submucosa. Magnificación original x20 (izquierda y derecha) y x40 (centro).....30

Figura 8.

Localización inmunohistoquímica de ASIC2 en la faringe humana. El patrón de inmunomarcaje es compatible con su localización en los nervios y vasos de la faringe. Magnificación original x20 (izquierda y derecha) y x40 (centro).....31

Figura 9.

Localización inmunohistoquímica de ASIC2 en la faringe humana. El patrón de inmunomarcaje es compatible con su localización en los nervios de la faringe, incluidas algunas formaciones nerviosas sensitivas. Magnificación original x20 (imágenes superiores e inferior izquierda) y x40 (inferior derecha).....31



1. RESUMEN

Los reflejos son respuestas motoras automáticas e involuntarias a estímulos sensitivos específicos. La actividad refleja alcanza gran complejidad a nivel de la faringe puesto que esta participa en múltiples funciones que tienen su base en actividades reflejas como tragar, succionar, respirar, hablar, masticar, las náuseas, el vómito, la tos o el ronquido. Cabe esperar por tanto que los receptores que desencadenan estas respuestas sean estructuras nerviosas capaces de transducir estímulos de acortamiento-estiramiento muscular y convertirlos en impulsos nerviosos. No obstante también es posible que las aferencias de los músculos faríngeos tengan exclusivamente base molecular y cualquier nervio sensitivo pueda conducir estímulos mecánicos al sistema nervioso. En los últimos años se han descubierto diferentes familias de canales iónicos que intervienen en la mecanorrecepción.

El presente trabajo fin de master está estructurado en dos partes, la primera es una revisión de la propiocepción orofaríngea, la segunda consiste en un trabajo de experimentación encaminado a la búsqueda de propioceptores u otro tipo de mecanorreceptores en la musculatura faríngea humana, así como la detección inmunohistoquímica de algunas posibles mecanoproteínas en las paredes de la faringe humana.

Palabras clave: *propiocepción; faringe; husos neuromusculares; mecanorreceptores; reflejos.*

SUMMARY

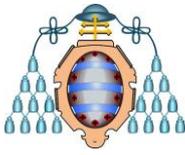
Reflexes are automatic and involuntary motor responses to specific sensory stimuli. The complex reflex activity reaches the level of the pharynx as this participates in many functions that are based on reflex activities such as swallowing, sucking, breathing, talking, chewing, nausea, vomiting, coughing or snoring. Therefore it is hoped that the receptors trigger these responses are able to transduce neural structures stimuli muscle shortening-stretch and turn them into nerve impulses. However it is also possible that pharyngeal



muscle afferents have exclusively molecular basis and any sensitive nerve may lead mechanical stimuli to the nervous system. In recent years different families of ion channels involved in mechanoreception have been discovered.

This master work is structured in two parts: the first is a review of oropharyngeal proprioception, the second is an experimental work aimed at finding proprioceptors or other mechanoreceptors in the human pharyngeal muscles and the immunohistochemical detection of some possible mecanoproteínas on the walls of the human pharynx.

Key words: *proprioception; pharynx; muscle spindles; mechanoreceptors; reflex.*



2. INTRODUCCIÓN

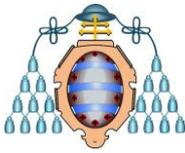
Los reflejos son respuestas motoras automáticas e involuntarias a estímulos sensitivos específicos. O también podrían definirse como movimientos que se repiten siempre y de la misma manera cuando el estímulo sea el adecuado y tenga la intensidad suficiente.

Los músculos de la cabeza participan en numerosos reflejos de importancia capital para la el mantenimiento de la supervivencia del individuo que van desde la regulación de la fuerza y contracción de los músculos masticadores, al comportamiento de los músculos faciales, la contracción de los músculos que forman la cuerda vocal inferior, o la contracción de los músculos velopalatinos y faríngeos para el inicio de la deglución.

La actividad refleja alcanza niveles de máxima complejidad a nivel de la faringe porque la estructura de los arcos nerviosos es común para varios reflejos y un mismo estímulo puede desencadenar la activación de varios arcos. La región orofaríngea, por ejemplo, participa en múltiples funciones que tienen en su base actividades reflejas: tragar, succionar, respirar, hablar, masticar, las náuseas, el vómito, la tos o el ronquido (Miller, 2002). El brazo aferente de todas estas actividades depende de la inervación sensitiva de la zona estimulada, mientras que el brazo eferente suele ser múltiple e involucra a los músculos que movilizan la mandíbula, los músculos de la cara, labios, lengua, mejillas, paladar, laringe y faringe.

Algunas de las actividades reflejas mencionadas, tienen su punto de partida en estiramientos y/o alargamientos de los propios músculos faríngeos (sensibilidad propioceptiva) y, por tanto, es esperable que los receptores que las desencadenan sean estructuras nerviosas capaces de transducir estímulos de acortamiento-estiramiento muscular y convertirlos en impulsos nerviosos. En la mayoría de los músculos esqueléticos las estructuras encargadas de esta función son los husos neuromusculares (Zelena, 1994).

La suplencia nerviosa macroscópica de la faringe así como la inervación motriz microscópica de los músculos que la forman (especialmente los músculos constrictores) es bien conocida (Mu y Sanders, 2007) mientras que la inervación sensitiva es un aspecto prácticamente olvidado. Pero con relación a la inervación propioceptiva, Lazarov (2007)



afirma el nervio trigémino es el responsable de este tipo de inervación en todos los músculos cefálicos. Como la faringe no tiene inervación por el trigémino debería de concluirse que los músculos faríngeos no tienen inervación propioceptiva. Apoyando a esta opinión está el hecho de que nunca se hayan detectado husos neuromusculares típicos en los músculos faríngeos. Sin embargo, estos músculos son capaces de contraerse y modificar el tono muscular permanentemente para determinar la respuesta motora adecuada a las actividades reflejas en las que participan. Por tanto, es plausible pensar que exista un sistema propioceptivo atípico, que recoja la actividad de estos músculos y que supere el hecho de que la musculatura faríngea está libre de husos neuromusculares. Un intento de tipificación de los posibles mecanorreceptores faríngeos fue el trabajo de fin de master de M. Lobato (2011) y la comunicación al XXV Congreso de la Sociedad Anatómica Española de 2011 presentada por Vega y Cols. La parte morfológica llevada a cabo en el presente estudio trata de profundizar en esos hallazgos.

No obstante también es posible que las aferencias de los músculos faríngeos tengan exclusivamente base molecular y cualquier nervio sensitivo pueda conducir estímulos mecánicos al sistema nervioso. En este sentido, en los últimos años, se han descubierto diferentes familias de canales iónicos que intervienen en la mecanorrecepción (ver Belmonte y Viana, 2008; Del Valle y Cols., 2012).

El presente trabajo fin de master está estructurado en dos partes. La primera es una revisión de la propiocepción orofaríngea, destacando los datos sobre la inervación microscópica de esta región y los principales reflejos relacionados con ella. En la segunda, se ha realizado un trabajo de experimentación encaminado a la búsqueda de propioceptores u otro tipo de mecanorreceptores en la musculatura faríngea humana, así como de la detección inmunohistoquímica en las paredes de la faringe de algunas posibles mecanoproteínas.



3. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

3.1. Inervación de la faringe humana

3.1.1. Inervación macroscópica de la faringe

La información sensitiva de la cabeza es mediada principalmente por el nervio trigémino (V) con la contribución de los pares craneales facial (VII), glossofaríngeo (IX) y vago (X), aunque la propiocepción de ésta parece estar relacionada exclusivamente con el nervio trigémino (Lazarov, 2007). La faringe, en concreto, está inervada, desde el punto de vista motor y sensitivo, por ramas del plexo faríngeo, derivado de los pares IX y X, y una pequeña contribución del par VII (Shimokawa y Cols., 2004).

3.1.2 Inervación sensitiva microscópica de la faringe

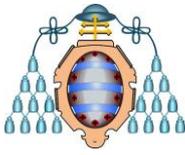
3.1.2.1 Inervación sensitiva general

La datos disponibles relacionados con la inervación sensitiva de la faringe son escasos, y la mayoría se limitan a textos de más de 50 años (Seto, 1963) en los que se utilizan técnicas de impregnación argéntica o al tetróxido de osmio-yoduro de zinc para marcar los elementos nerviosos. Dada la inespecificidad de los marcajes con sales de plata muchos de esos datos deben ser puestos en entredicho. Los estudios posteriores tampoco han añadido gran información al respecto.

En un estudio realizado por Yoshida y Cols. (2000) en la faringe humana se determinó que la mayor parte de las fibras sensitivas de la faringe proceden del nervio glossofaríngeo, aunque las correspondientes a la parte más baja y los pliegues glossoepigloticos y el seno piriforme también son de origen vagal. La mayor densidad de fibras la encuentran en la parte más inferior de la mucosa de la fosa palatina y en las paredes laterales de la hipofaringe, observando además que estas fibras presentan inmunorreacción para la sustancia P y el péptido relacionado genéticamente con la calcitonina (se trataría por tanto de fibras nerviosas relacionadas con la nocicepción).

3.1.2.2 Inervación propioceptiva

Los datos relativos a la inervación propioceptiva de la faringe, son casi inexistentes y en la mayoría de los casos reportan resultados negativos. En los músculos de la faringe, que son músculos estriados de contracción voluntaria, o al menos parcialmente voluntaria, los



propioceptores son los mecanorreceptores especializados del músculo esquelético y están representados por los husos neuromusculares y los órganos tendinosos de Golgi (Zelena, 1994).

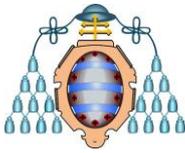
Sin embargo, hace ya algunos años Bossy y Vidic (1967) cuestionaron la existencia de husos neuromusculares en la faringe humana, y Seto (1963) en su libro “*Studies on the sensory innervation (human sensibility)*” no describe la presencia de husos neuromusculares en los músculos de esta región. Consecuentemente, los músculos de la faringe han sido considerados libres de husos neuromusculares (Kuehn y Cols., 1990; Liss, 1990), aunque Sengupta y Sengupta (1978) sí encontraron husos neuromusculares en el músculo constrictor inferior del mono *Macaca irus*. Un hecho importante a destacar y que merece ser objeto de posteriores estudios, es que los músculos de la faringe no están inervados por el trigémino, y por lo tanto siguiendo el concepto de Lazarov (2007) no tendrían inervación propioceptiva; y, curiosamente, el único músculo de la región que presenta inervación por dicho nervio, el *tensor palatini* si que posee husos neuromusculares (Liss, 1990; Kuehn y Cols., 1990), lo que refuerza la concepción de Lazarov (2007) sobre la propicepción cefálica.

3.2. Principales reflejos faríngeos en el hombre

Los diferentes tipos de receptores sensoriales que se localizan en cavidad oral y la faringe, especialmente a nivel de la faringe, son el punto de partida de los reflejos que controlan los músculos de toda la cabeza, vías respiratorias y parte superior del tracto gastrointestinal (Miller, 2002).

La mayoría de estos reflejos sirven para proteger la integridad tisular de la cavidad oral y la lengua pero también para la prevención de la aspiración en la vía aérea superior. En algunos casos se trata de reflejos simples en los que está implicado un arco aferente eferente circunscrito, mientras que en otros al menos las eferencias son complejas y múltiples. La mayoría de los reflejos de esta región se combinan con respuestas orales y faríngeas más complejas como la masticación y la vocalización.

Como se comentó en el apartado precedente, la faringe posee una serie de receptores sensoriales con los que responde a los cambios en el tacto/presión o a estímulos químicos.



Esta información sensorial de la faringe envía permanentemente señales hacia el sistema nervioso central para ajustar la contracción de los músculos constrictores de la faringe.

¿Cuál es el substrato anatómico de los reflejos? Los reflejos nerviosos, en los vertebrados están constituidos por arcos bineuronales y monosinápticos, con centro en el asta anterior de la médula o en los núcleos motores de los nervios craneales; en la mayoría de los casos hay, además, interneuronas. La neurona aferente (sensitiva) conecta en su extremo periférico con receptores más o menos específicos mientras que las neuronas eferentes deben de hacerlo con los músculos estriados mediante placas motrices, o con músculos lisos y/o glándulas por medio de una vía vegetativa, simpática o parasimpática.

La mayoría de los reflejos funcionan como apoyo a las redes de neuronas en el control de las respuestas motoras complejas. El sistema nervioso de los mamíferos se basa en continuas redes de reflejos que modifican las neuronas motoras que son las que reciben información sináptica de centros mayores para controlar o modular la expresión, el transporte de comida, masticación, deglución, etc. Cada una de estas complejas respuestas motoras es modulada por los arcos reflejos que ajustan la señal motora final a los músculos designados.

Dentro de los reflejos faríngeos, hay que diferenciar los simples de los complejos.

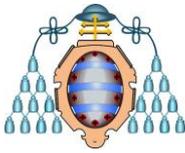
3.2.1. Respuestas reflejas simples

3.2.1.1. Protección de la faringe y vías respiratorias altas

a) Reflejo de la náusea

Las náuseas son reflejos inducidos por la estimulación de las regiones faríngeas y velo del paladar o al tocar la base de la lengua, paladar blando, úvula o pared posterior de la faringe (Roberts y Cols., 1989). El reflejo nauseoso es considerado un reflejo de protección que intenta evitar que cualquier material no deseado entre en la faringe.

Este reflejo se puede definir simplemente como la constricción de la faringe, pero a menudo se asocia con respuestas de comportamiento más complejas como reducción del movimiento de la mandíbula, llevar la lengua hacia abajo y adelante, constricción del velo del paladar y tos leve.



Las náuseas más graves que involucran contracción faríngea y del velo del paladar con arcadas, parecen ser una combinación de las respuestas reflejas tanto de las náuseas como de algún aspecto emético. La respuesta del reflejo nauseoso varía considerablemente entre sujetos (Perlman y Cols., 1989; Leder, 1996) y el método más eficaz para bloquear el reflejo de la náusea en humanos es inducir un bloqueo del plexo faríngeo (Valley y Cols., 1992).

b) Reflejo apneico

La estimulación de las regiones de la cavidad oral, faringe y laringe produce reflejos que protegen el tracto respiratorio. Estos reflejos consisten en la aposición de la epiglotis y pliegues ariepiglóticos, aducción de cuerdas vocales verdaderas y falsas y la inducción del cese respiratorio (ej: apnea del sueño). La estimulación faríngea y laríngea puede inducir por tanto a apneas prolongadas (Davies y Cols., 1988)

c) Reflejo de aspiración

Al estimular mecánicamente la mucosa nasofaríngea se originan repetidas contracciones del diafragma. Esto ha sido descrito como el reflejo de la aspiración (Korpas y Tomori, 1979).

3.2.1.2. Reflejos respiratorios

Es conocido que la estimulación de la laringe tiene marcados efectos sobre el aparato respiratorio, pero reflejos similares, son a menudo inducidos por estimulación de la faringe. La estimulación de ésta, puede inducir por tanto a la espiración forzada, afectando a secreciones bronquiales e inducir constricción (Karlsson y Cols, 1998). Este tipo de reflejos protegen el sistema respiratorio de la invasión de materiales y complementan reflejos similares inducidos a la región orofacial.

3.2.1.3. Reflejos cardiovasculares

Algunos reflejos desencadenados por estimulación faríngea pueden afectar al control autonómico del sistema cardiovascular induciendo bradicardia y con menor frecuencia taquicardia. A menudo, estas respuestas cardiovasculares son inducidas por la deglución (Miller, 2002); la cuestión es si un determinado estímulo de la región faríngea (ej: mecánico, temperatura, presión) induce el reflejo cardiovascular independientemente de tragar, al tragar o después de tragar.



3.2.2 Respuestas reflejas complejas

3.2.2.1 Respiración oral

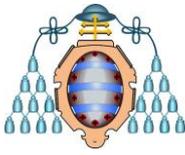
La respiración oral es un término que se aplica a la respiración crónica a través de la boca durante la actividad normal, sin hacer ejercicio y en algunas ocasiones este tipo de respiración se asocia a estrechamiento de las fosas nasales y orofaringe. Cuando hay una reducción grande en las vías aéreas se pueden poner en peligro las concentraciones adecuadas de oxígeno y dióxido de carbono.

La entrada de aire para estos sujetos supone un esfuerzo y genera una resistencia en la región orofaríngea. El origen de esta percepción sensorial sigue siendo desconocido. Los receptores sensoriales responden a la reducción de presión existente en la faringe y laringe. Cuando la obstrucción nasal disminuye el flujo de aire suficientemente como para modificar la estimulación de estos receptores de presión, el sistema nervioso central induce la respiración oral separando los labios, aplanando la lengua, levantando el velo del paladar y bajando ligeramente la mandíbula. Estudios realizados en animales sugieren que la inducción de la respuesta neuronal compleja orofaríngea de respiradores orales depende principalmente de los cambios en los niveles sistémicos de gases en sangre (Miller, 2002). Este y otros resultados indican que el cerebro puede controlar sinápticamente músculos específicos de la región orofaríngea y sus motoneuronas.

3.2.2.2 Mantenimiento de la permeabilidad faríngea: respuesta lengua-vías aéreas

La vía respiratoria se extiende desde las fosas nasales y los labios, hasta los alvéolos pulmonares. En diferentes regiones por encima de la tráquea se puede incrementar la resistencia de las vías respiratorias; estas zonas son el exterior de las fosas nasales en nasofaringe, la lengua en la orofaringe y el hueso hioides y las cuerdas vocales en la laringe (Van de Graaff y Cols., 1984). Los músculos de estas regiones, tienen la capacidad de reducir significativamente la resistencia, y así evitar la obstrucción; durante la respiración están activos, y mejoran su actividad si hay cambios en la estimulación química de receptores de las vías respiratorias periféricas y centrales en relación a los niveles de oxígeno y dióxido de carbono.

Como parte de la vía aérea superior que es, la faringe, es una de esas regiones en las que se puede alterar la resistencia de las vías respiratorias. Durante el sueño en sujetos normales, la vía aérea superior en este nivel se colapsa parcialmente aumentando así la resistencia al



paso del aire (Pierce y Worsnop, 1999). La posición de la lengua es uno de los principales factores que determinan la permeabilidad de la faringe. La actividad del músculo geniogloso puede mejorar la mecánica de fluidos de las vías respiratorias superiores mediante la dilatación de la orofaringe y la reducción de la resistencia al flujo. Algunas personas que padecen apnea obstructiva del sueño, tienen un colapso mayor de las vías respiratorias superiores que es suficiente para inducir la hipoxia. Este tipo de afirmaciones, demuestran que existe una pérdida de tono en la orofaringe. La aplicación de un anestésico tópico en la membrana de las vías respiratorias superiores mucosas (nariz, faringe y laringe) hace que se elimine la información sensorial de presión, dando lugar a una obstrucción de las vías faríngeas y consecuentemente la muerte. Este efecto reflejo se muestra sólo en animales vivos; los animales muertos tienen una vía aérea permeable resistente al colapso. Este hallazgo sugiere que los músculos de las vías respiratorias cierran la faringe a menos que la información sensorial de las presiones cíclicas de aire estén presentes. La aplicación de oscilaciones de presión en la vía aérea superior de algunos animales activa la actividad electromiográfica del músculo geniogloso, estas oscilaciones simulan a los ronquidos y sugieren que la vía aérea superior tiene mecanorreceptores en la mucosa que inducen a la actividad de este músculo manteniendo una vía aérea permeable (Eastwood y Cols., 1999).

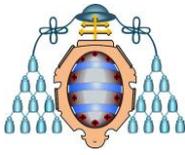
El arco hioideo es otra región que puede afectar la permeabilidad de la vía aérea (Brouillette y Thach, 1980), en él se insertan más de doce músculos. Este arco, rodea parcialmente a la hipofaringe por encima de la laringe y por debajo de la lengua (Van de Graaff y Cols., 1984).

El aumento de la presión negativa en las vías respiratorias superiores, mejora la amplitud y duración de la actividad electromiográfica de los músculos de esta zona. Los músculos que se insertan en el arco hioideo pueden afectar la permeabilidad y resistencia de la vía aérea superior y son reflejo controlado por los cambios químicos y de presión.

3.2.2.3 Transporte y protección de la faringe

a) Deglución faríngea

El reflejo más complejo de la región faríngea es tragar. La deglución faríngea involucra a una serie de músculos entre los que se encuentran músculos del paladar blando, lengua, hioides, faringe y laringe.



Cuando se traga, el paladar blando se eleva, las paredes faríngeas se aproximan, el hioides y laringe también se elevan, el vestíbulo de la laringe se cierra, la epiglotis se inclina hacia abajo y el esfínter esofágico superior se relaja y se abre (Donner y Cols., 1985) Los músculos intrínsecos de la lengua tienen la capacidad de cambiar su forma aplanándola o arrugándola. La faringe, como se ha mencionado anteriormente se compone de los músculos constrictores superior, medio e inferior los cuales se superponen para formar una vaina continua que se extiende desde el cráneo hasta el esófago. Estos músculos son delgados y sus fibras se disponen orientadas oblicuamente insertándose en el rafe medio posterior (Bosma y Cols., 1986). La pared faríngea posterior tiene una capa delgada de tejido elástico que permite a la faringe expandirse y contraerse sin llegar a plegarse. Durante la deglución, las paredes laterales y posterior de la faringe se mueven en sentido medial y anterior reduciendo el área de la faringe durante el movimiento ondulatorio en dirección caudal.

Los músculos involucrados en la deglución faríngea son inervados por motoneuronas de varios nervios craneales: trigémino (V), facial (VII), glossofaríngeo (IX), vago (X), accesorio (XI) e hipogloso (XII).

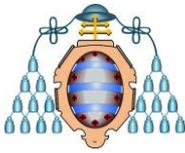
Las regiones que permiten la deglución faríngea con la aplicación de presión o diversos líquidos tanto en humanos como en animales de laboratorio incluyen: paladar blando, úvula, superficie dorsal de la lengua, istmo de las fauces, pared faríngea posterior, superficie faríngea de la epiglotis, y seno glosopiglótico (Miller, 2002).

La eficacia de provocar deglución faríngea en humanos con presión o tacto, depende del sitio y la intensidad de la estimulación (Pommerenke, 1928). El contacto con una varilla por ejemplo provoca la deglución faríngea más fácilmente cuando la aplicamos en el istmo de las fauces que si la aplicamos en la úvula y paladar blando.

b) Vómito

El vómito es un problema médico común; es otro reflejo complejo que implica la contracción secuencial de varios músculos diferentes que incluyen a los de la región orofaríngea. La respuesta emética se caracteriza principalmente por tres componentes: las náuseas, las arcadas y la expulsión propiamente dicha, las tres forman parte de un único proceso.

A diferencia de la faringe para tragar, el reflejo emético implica principalmente músculos somáticos con contribuciones de músculos orofaríngeos. Los músculos de la boca, faringe



y esófago responden como un reflejo coordinado que lo que hace es cambiar la motilidad intestinal, inhibir el tono gástrico y abrir las partes tanto superior como inferior de los esfínteres esofágicos.

3.3. Bases moleculares de la mecanosensibilidad

3.3.1. Introducción

Aunque se sigue aceptando con carácter general que los estímulos mecánicos se transducen como sensibilidad mecánica a nivel de los mecanorreceptores, algunos descubrimientos de los últimos años sugieren que no necesariamente debe de ser así, sino que depende de que las fibras nerviosas que recogen la sensibilidad de una determinada zona del cuerpo expresen una serie de moléculas. De ser cierto este planteamiento se obviaría la presencia de mecanorreceptores específicos en determinados órganos y tejidos, como sería la propia ausencia de husos neuromusculares en los músculos faríngeos.

Además, es posible que algunas de las respuestas de los músculos concebidas hasta ahora como resultado de un circuito nervioso reflejo, no necesiten de la participación de estructuras nerviosas sino que se deban a la activación de determinados canales iónicos.

Por último, se hace pues imprescindible, desde este nuevo enfoque, conocer exactamente la distribución en un tejido de los canales iónicos que pueden estar implicados en una determinada función. En los primeros momentos se asoció un determinado tipo de canal iónico a cada tipo de sensibilidad; sin embargo con posterioridad se comprobó que todo resulta más complejo de lo esperado y que la mayoría de los canales están implicados en diferentes tipos de sensibilidad. Es decir: cada canal iónico participa en más de un tipo de sensibilidad, y cada sensibilidad está determinada por más de un tipo de canal (ver para una revisión reciente Belmonte y Viana, 2008).

En este apartado se consideran, exclusivamente, los canales que están relacionados con la mecanotransducción, ya que podrían ser, a nivel molecular, los responsables de respuestas musculares que hasta ahora se atribuyen a arcos reflejos neuronales.

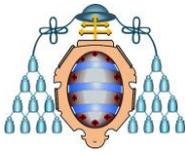


Actualmente se admite que la mayoría de las células de los vertebrados son capaces de percibir no solo señales bioquímicas sino también factores físicos como la elasticidad de la fuerza, la geometría y la matriz, y que estos pueden desempeñar papeles importantes en la definición de funciones de células y tejidos, morfología y regeneración (Vogel y Sheetz 2006). La **mecanobiología**, en su acepción más amplia, podría definirse como la ciencia que estudia los efectos de los agentes mecánicos, en definitiva de las fuerzas, sobre las células y los tejidos. También puede definirse como el control de la función celular a través de la alteración mecánica en la conformación proteica (*mechanosensing*), especialmente de su citoesqueleto. Y entre los aspectos que debe de estudiar esta disciplina se encuentran las moléculas que señalizan esos efectos mecánicos, lo que ha dado origen a una rama dentro de la disciplina conocida como **mecanotransducción**. Esta comprende varias etapas: mecanorrecepción o mecanoacoplamiento, acoplamiento bioquímico, transmisión de la señal y respuesta de la célula efectora (ver Lim y Cols., 2010). Entre los múltiples sistemas que intervienen en la mecanotransducción se encuentran los canales iónicos que regulan el flujo de iones a través de las membranas celulares y que son los que constituyen el objetivo de la segunda parte experimental de este trabajo fin de máster.

Existen evidencias de que las proteínas que forman parte de los canales iónicos, especialmente las de algunos miembros de la familia de las proteínas ASIC (acid-sensing ion channels) y TRP (transient receptor potencial) están implicadas en la detección y/o adaptación celular a situaciones biológicas relacionadas con cambios mecánicos en el entorno pericelular o intracelular.

3.3.2. Canales iónicos relacionados con la mecanotransducción

Es decir, las deformaciones en la membrana de los distintos tipos de células que forman los mecanorreceptores desencadenan la apertura de canales iónicos mecanosensibles que inician una despolarización, convirtiendo así el estímulo mecánico en una señal eléctrica. Por otro lado, aunque la mayoría de los estudios realizados hacen especial hincapié en el papel de la membrana plasmática en la apertura de los canales

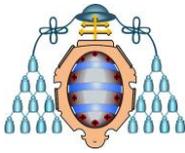


iónicos, parece lógico pensar que algunas estructuras intracelulares y/o extracelulares, como las proteínas del citoesqueleto y la matriz extracelular, puedan estar implicadas en la mecanotransducción (Arnadóttir y Chalfie, 2010).

En los últimos años se han descubierto en los invertebrados una serie de canales que o son mecanotransductores *per se* o son necesarios para la mecanotransducción. Hasta la fecha, existen evidencias experimentales de que miembros de cuatro familias de canales iónicos podrían ser candidatos a intervenir en los procesos de mecanotransducción. Son: la familia de las degenerinas/canales epiteliales de Na^+ (DEG/ENaC), la de los canales de receptor transitorio (TRP), los canales de dos dominios de potasio (K2P; TERK1, TREK, TRAAK) y los canales MscS-like los cuales se cierran mecánicamente (Gillespie y Wallcer, 2001; Lumpkin y Caterina, 2007; Anadóttir y Chalfie, 2010).

3.3.2.1. Degenerinas/canales epiteliales de Na^+ (DEG/ENaC)

Las DEG/ENaC⁺ son proteínas que pueden funcionar como mecanosensoras en un amplio rango de células (Mano y Driscoll, 1999). Todos los miembros de esta familia tienen una estructura común consistente en dos regiones transmembrana hidrófobas, los dominios amino y carboxilo terminales cortos y una región extracelular grande, que supone más del 50% de la proteína, altamente conservada y con residuos de cisteína. En mamíferos se han descrito los canales de sodio epiteliales y los canales de sodio cerebrales. Los canales de sodio epiteliales (ENaC) se expresan tanto en epitelios como en endotelios, osteoblastos, queratinocitos, células quimiorreceptoras gustativas, linfocitos y neuronas sensitivas. Están implicados, además de en procesos de mecanotransducción, en la nocicepción, gametogénesis, reabsorción de sodio y regulación de la presión sanguínea (Drummond y Cols., 2001; Mano y Driscoll, 1999). Están constituidos por tres subunidades: α , β y γ , aunque algunos autores también han descrito una cuarta subunidad, la δ (Bangel-Ruland y Cols., 2009; Waldmann y Cols., 1995; Yamamura y Cols., 2008). La subunidad α ENaC es imprescindible para su actividad, mientras que las subunidades β y γ favorecen e incrementan la actividad del canal. La subunidad δ sustituiría a la subunidad α , produciendo canales iónicos con distinta conductancia iónica, tiempo de apertura y sensibilidad al amiloride (Meltzer y Cols., 2007). Los datos disponibles sobre la estequiometría del canal resultan controvertidos, puesto que aunque se sabe que los canales están formados por las subunidades α , β y γ se desconoce la proporción en la que participa



cada una de ellas. Varios trabajos proponen que los ENaC estarían ensamblados como tetrámeros, compuestos por dos subunidades α , una β y una γ (Anantharam y Palmer, 2007; Dijkink y Cols., 2002). Sin embargo, un estudio reciente de Stewart y Cols. (2011) apunta a que se trata de un trímero, formado por una subunidad α , una β y una γ .

3.3.2.2. Canales iónicos sensibles al ácido (acid-sensing ion channels, ASICs)

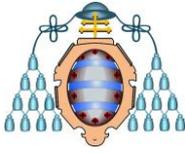
El otro grupo de canales de interés, en este trabajo, los ASIC, pertenece a la familia de los canales de sodio cerebrales (BNaC), denominados así porque fueron descubiertos inicialmente en neuronas del cerebro. Se expresan en neuronas del sistema nervioso central y periférico, así como en tejido no nervioso como testículos, glándula pituitaria y hueso (Lingueglia, 2007; Waldman y Cols; 1997), son insensibles a voltaje y se activan por protones extracelulares ya sea directamente o por asociación con otras isoformas.

Cada canal está formado por cuatro subunidades que pueden ser idénticas o no. Se han descrito cuatro genes que codifican para siete isoformas: ASIC1 o ACCN2 (isoformas 1a, 1b y 1b2), ASIC2 o ACCN1 (isoformas 2a y 2b), ASIC3 y ASIC 4.

3.3.2.3. Canales iónicos de la superfamilia TRP (transient-receptor potential)

Son proteínas integrales de la membrana celular que funcionan como canales catiónicos no selectivos ion. Son canales no selectivos del catión, algunos son selectivos para el Ca^{2+} e incluso el Mg^{2+} .

Están subdivididos en siete subfamilias: TRPC (canónico), TRPV (vanilloide), TRPM (melastatina), TRPP (policistina), TRPML (mucolipina), TRPA (anquirina) y TRPN (NOMPC-like). Dentro de estas familias se han encontrado al menos 28 miembros (Clapham y Cols., 2005). Estructuralmente, una proteína TRP típica contiene seis dominios de transmembrana (S1 a S6) con un lazo re-entrante a nivel del poro entre S5 y S6. Los dominios intracelulares de N y de C son de longitud (Clapham y Cols., 2005).



Los canales TRP se expresan en diversos tejidos y tipos celulares e intervienen en procesos fisiológicos muy (véase para una revisión de la literatura Eid y Cortiight, 2009; Nilius y Owsianik, 2007).

Además de otras funciones bien conocidas, algunos canales TRP parecen intervenir en la mecanotransducción. Tal es el caso del TRPV4, (Liedtke, 2005), TRPV2 (Muraki y Cols., 2003) y algunas isoformas de TRPA y TRPM (Lumpkin y Caterina, 2007).

Hasta la fecha no existe ningún estudio sobre la distribución de los canales iónicos de las familias antes indicadas en la faringe de los vertebrados.



4. OBJETIVOS

El presente estudio tiene como **objetivo general** contribuir al conocimiento de la mecanobiología de la faringe, tanto desde un punto de vista nervioso como molecular.

Los **objetivos específicos** son:

- 1.- Tratar de localizar en los músculos de la faringe humana mecanorreceptores que puedan suplir la ausencia de husos neuromusculares;
- 2.- Estudiar la distribución de proteínas relacionadas con la mecanotransducción en los diferentes tejidos de la faringe, con especial referencia a los nervios que la suplen.



5. MATERIAL Y TECNICAS

5.1. Material

El material utilizado para la realización del presente trabajo de investigación, consistió en muestras de musculatura faríngea de sujetos sin enfermedad neurológica conocida (n = 7; 5 hombres y 2 mujeres; rango de edad: 41-73 años) obtenidas en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo. Las muestras se obtuvieron de sujetos fallecidos en accidentes de tráfico durante el proceso de extracción de órganos para transplante, en cumplimiento con la legislación española y la declaración de Helsinki II.

En cada faringe se aislaron segmentos de la pared lateral de la nasofaringe; pared lateral de la velofaringe; pared lateral de la orofaringe; pared lateral de la hipofaringe; pared posterior de la orofaringe. Las muestras consistían en piezas de 1-2 cm² que contenían todo el espesor de la pared faríngea y fueron lavadas en solución salina fría, fijadas en formaldehído 10% (en PBS 0.1M, pH 7.4 a 4° durante 24 horas), y a continuación deshidratadas y embebidas en bloques de parafina de manera rutinaria. Los bloques se cortaron a un grosor de 10 µm y 40 µm y los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados y fueron procesadas para inmunohistoquímica.

5.2. Técnicas

5.2.1. Inmunohistoquímica simple

Se realizó mediante la técnica de la peroxidasa-antiperoxidasa indirecta. Para los estudios de localización de terminaciones nerviosas sensitivas intramusculares se utilizaron cortes de 10 µm y 40 µm de grosor, mientras que para la detección de las proteínas mecanotransductoras se usaron exclusivamente cortes de 10 µm de grosor. Los cortes fueron desparafinados y rehidratados y a continuación se lavaron con 0.05 M HCl Tris buffer (pH 7.5) que contiene 0.1% de seroalbúmina bovina y 0.1% de Triton X-100. A continuación se bloquearon la actividad de la peroxidasa endógena (H₂O₂ al 3%) y las uniones inespecíficas (suero fetal bovino 10%), para pasar a incubar los cortes durante toda la noche en cámara húmeda, a 4° C con los anticuerpos primarios anti-S100, anti-PGP 9.5 y anti-enolasa neuronal específica, y los anti-TRP y anti-ASIC seleccionados (ver tabla 1).



Los anticuerpos se diluyeron en una solución de Tris-HCl buffer (TBS) (0.05M, pH 7.5) con seroalbúmina bovina al 0.1%, y suero bovino fetal al 0.2% y Tritón X-100.

Tras la incubación con los anticuerpos primarios, las muestras fueron lavadas con la misma solución tampón (TBS), e incubadas con los IgG anti-ratón o anti-conejo del sistema Dako Envision (DakoCytomation, Dinamarca), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron los cortes y se visualizó la inmunoreacción usando 3-3'-diaminobencidina como cromógeno.

Como control, ciertas secciones fueron procesadas de la misma manera descrita anteriormente pero sustituyendo el anticuerpo primario por suero de conejo o de ratón no inmune, u omitiendo los anticuerpos primarios en la incubación. Para determinar detalles estructurales, las secciones fueron ligeramente tratadas con tinción de contraste hematoxilina-eosina.

Los controles de la especificidad de la inmunorreacción se realizaron por exclusión del anticuerpo primario o por incubación con suero de conejo no inmune en lugar del anticuerpo primario.

5.2.2. Immunohistoquímica doble

Las secciones fueron procesadas para la detección simultánea de enolasa neuronal específica (usada para marcar axones; Vega y Cols., 1996) y proteína S100 (que marca las células de Schwann en los nervios periféricos y las células Schwann-like en los corpúsculos sensitivos; Vega y Cols., 1996). El doble inmunomarcaje se realizó en secciones de 40 μ m desparafinadas y rehidratadas y las uniones inespecíficas se bloquearon mediante incubación de las muestras en solución de 1% de seroalbúmina bovina en Tris buffer. A continuación los cortes se incubaron durante toda la noche en una cámara húmeda, Las secciones de 40 micras fueron incubadas después, durante una noche en una cámara de humedad a 4° C, con una mezcla (en proporción 1:1) de anticuerpos anti-S100 y anti-RT-97, o bien anticuerpos anti-S100 y anti-enolasa neuronal específica (diluidas en la solución buffer a 1:200 y 1:1000, respectivamente). Tras aclarado con TBS, las secciones fueron incubadas durante 1 hora con IgG de cabra anti-conejo conjugado con Alexa fluor 488 (Serotec, Oxford, UK) y diluida 1:1000 en una solución de TBS y suero



de ratón al 5% (Serotec). Después se lavaron de nuevo y se incubaron durante otra hora con IgG de asno anti-ratón conjugado con CyTM3 (Jackson-ImmunoResearch, Baltimore, MD, USA) diluido 1:50 en TBS. Ambos procesos se llevaron a cabo a temperatura ambiente en una cámara oscura húmeda. Para marcar los núcleos de las células se utilizó DAPI a una dilución de 10 mg/100 ml. Finalmente, las secciones se lavaron, deshidrataron y se montaron en Entellan®. El doble inmunomarcaje, y la tripe inmunofluorescencia, se detectó usando un microscopio de fluorescencia automática Leica DMR-XA con Leica Confocal Software, versión 2.5 (Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Germany) y las imágenes se capturaron usando el software Image J version 1.43 g Master Biophotonics Facility, Mac Master University Ontario.

(HYPERLINK "<http://www.macbiophotonics.ca/>" www.macbiophotonics.ca).



Tabla 1 Anticuerpos primarios usados en el estudio

Antígeno	Origen	Dilución	
ASIC1	Conejo	1:100	Abcam ¹
ASIC2	Conejo	1:200	Lifespan Biosciences ²
ASIC3	Conejo	1:100	Abcam ¹
TRPA1	Conejo	1:100	Ab Serotec ³
TRPC6	Conejo	1:100	Novus Biologicals Inc ⁴
TRPM8	Conejo	1:100	Abcam ¹
TRPV1	Conejo	1:100	Gentaur Europe BVBA ⁵
TRPV4	Conejo	1:100	Abcam ¹
NSE	Conejo	1:2000	Dako ⁶
PGP 9.5	Conejo	1:1000	Biogenesis ⁷
RT-97	Ratón	1mg/ml	Boehringer-Mannheim ⁸
S-100T	Conejo	1:1000	Dako ⁶

¹Cambridge, UK

²Seattle, WA, USA

³Oxford, UK

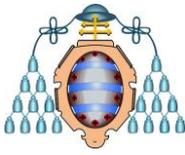
⁴Littleton, CO, USA

⁵Brussels, Belgium

⁶Glostrup, Denmark

⁷Poole, England, UK

⁸Mannheim, Germany



6. RESULTADOS

6.1. Organización de los nervios que suplen la faringe y formaciones nerviosas sensitivas

En las faringes estudiadas, procedentes de necropsias de sujetos libres de enfermedad nerviosa del servicio de Anatomía Patológica del HUCA, no se ha podido determinar en qué puntos de la superficie del órgano penetran los nervios. De cualquier forma en las secciones histológicas se han observado troncos nerviosos, de diferentes calibres, atravesando la capa muscular procedentes de la adventicia. En el espesor del estrato muscular, los nervios adoptan diferentes trayectos, en la mayoría de los casos paralelos a las fibras musculares. En el trayecto de las fibras nerviosas, o conectadas a colaterales separadas de ellas se observan formaciones nerviosas (determinada en base a la reacción inmunohistoquímica para los marcadores axónicos o gliales) que posiblemente correspondan con terminaciones nerviosas sensitivas (Figuras 1 a 3).

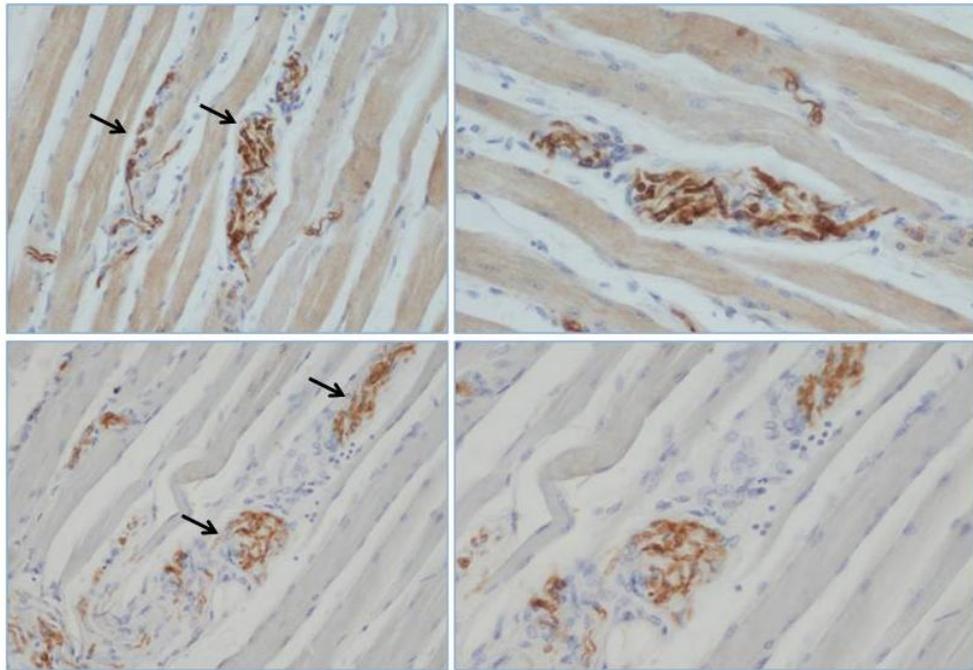
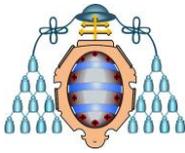


Figura 1.- Diferentes morfotipos de formaciones nerviosas sensitivas, de tipo corpuscular, en los músculos de la faringe. Enolasa neuronal específica. Magnificación original x20



Aunque previamente se ha descrito la existencia de diferentes morfotipos de receptores nerviosos en la adventicia de la faringe (ver Vega y Cols., 2011), nuestras observaciones se centran en el estrato muscular.

Tanto con los anticuerpos que marcan los axones, como con los que marcan las células de Schwann, en los músculos de faringe humanos existen formaciones cuya morfología sugiere que se trata de receptores sensitivos. Sin embargo, el hecho de que estos no hayan sido descritos previamente hace que la descripción que se realiza en los párrafos siguientes debe de tomarse con precaución. Lo que se identifica aquí como formaciones sensitivas, son corpúsculos formados por una o varias fibras nerviosas, situadas en el interior de una cápsula formada por una o varias capas.

En algunos casos, tienen formas alargadas y una fibra nerviosa única que penetra en la formación se ramifica, pero aparece delimitada en el interior de una aparente cápsula muy fina (Figura 1, las dos imágenes superiores). Otras veces, tienen aspecto de ovillos, redondeados y formados por una maraña de fibras nerviosas, bien delimitadas y capsuladas (Figura 1, imágenes inferiores; Figura 2). Estas imágenes se asemejan a los corpúsculos de Ruffini de otras partes del cuerpo.

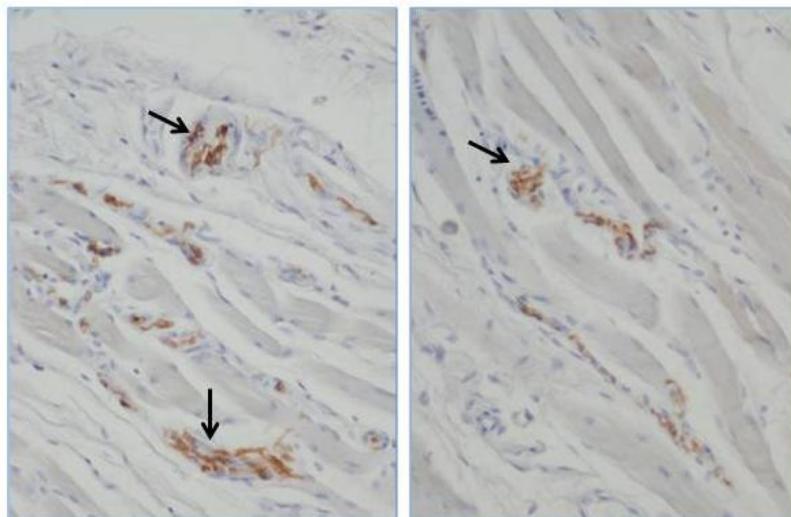
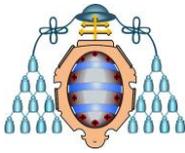


Figura 2.- Diferentes morfotipos de formaciones corpusculares en los músculos de la faringe. Las redondeadas pueden asimilarse a corpúsculos sensitivos de tipo Ruffini-like. Enolasa neuronal específica. Magnificación original x20



Finalmente, intercaladas en el trayecto de las fibras musculares se encuentran ocasionalmente formaciones nerviosas sensitivas representadas por acúmulos de núcleos de células no reactivas (seguramente de tipo fibroblástico) que contienen en su interior escasas fibras nerviosas (Figura 3, izquierda). En sección transversal se puede observar cómo las fibras nerviosas que lo forman se disponen entre grupos de fibroblastos sin estructura laminar (Figura 3, derecha).

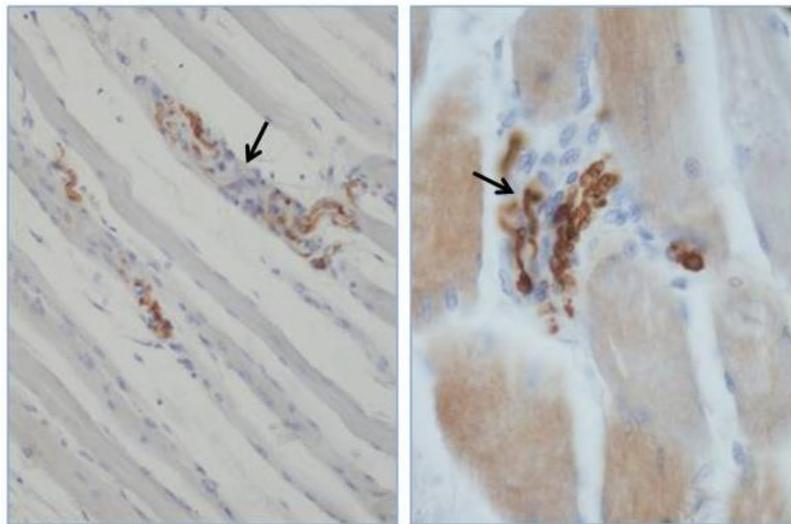
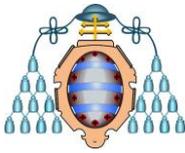


Figura 3.- Diferentes morfotipos de formaciones corpusculares en los músculos de la faringe. Proteína S100. Magnificación original x20 (izquierda) y x40 (derecha).

Además, en el espesor de las paredes de la faringe existen numerosos plexos perivasculares a veces en conexión con formaciones sensitivas redondeadas.

6.2. Las formaciones “espiroideas” en los músculos de la faringe

En los estudios precedentes del laboratorio donde se realizó este trabajo sobre este mismo tema, se describió un tipo especial de organización de las fibras nerviosas dentro de la musculatura de la faringe humana que se denominó formaciones sensitivas espiroideas por la organización tridimensional de los elementos neurales (Vega y Cols., 2011). En el presente estudio hemos tratado de profundizar en la identificación, estructura y localización de estas formaciones.



Se han encontrado formaciones espiroideas en todos los músculos de la faringe analizados, pero no en todas las secciones. Aparentemente, son más frecuentes en la parte periférica (inserción) de los músculos que en la parte central. Además, son de una longitud considerable pudiendo estimarse en algunos casos de más de 1 mm (en base a la escala de barras del microscopio). Con carácter general, las denominadas formaciones espiroideas están formadas por una fibra nerviosa única inmersa en una estructura de densa celularidad, con un trayecto marcadamente flexuoso o espiroideo (Figura 4). Excepcionalmente se han observado estructuras “cerradas” alargadas, con longitudes y posiciones dentro del músculo parecidas a las descritas para las formaciones espiroideas. Como se aprecia en la parte inferior de la figura 4, son formaciones fusiformes en las que la fibra nerviosa desaparece en su interior por uno de los polos, y en la que se aprecian colaterales en todo su trayecto.

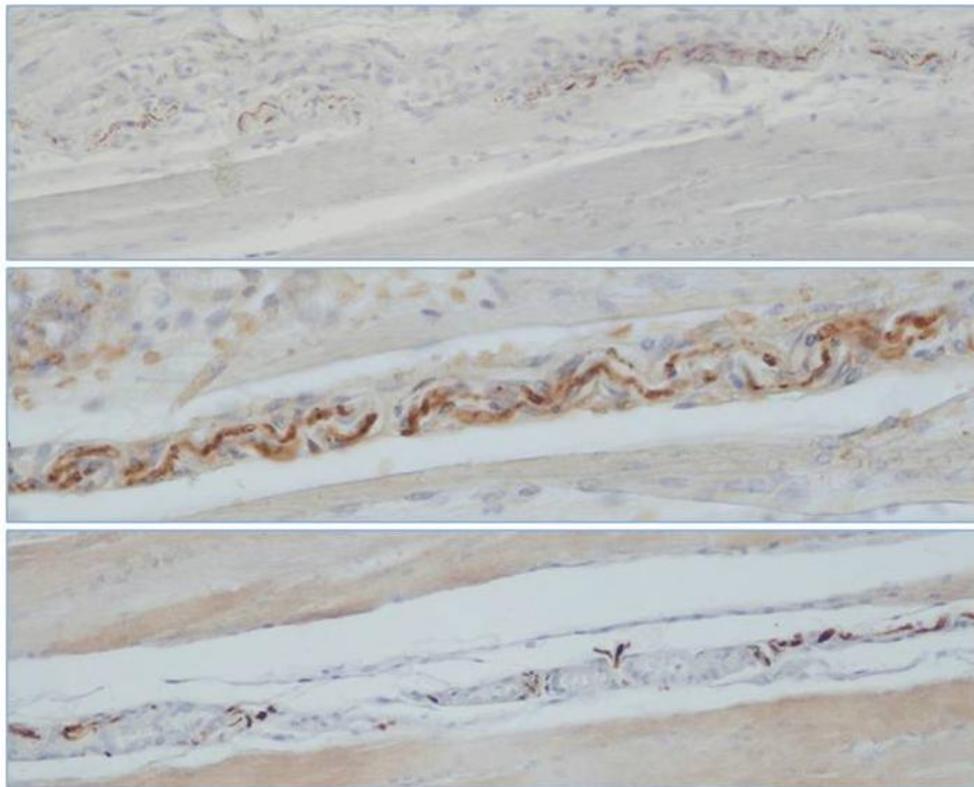
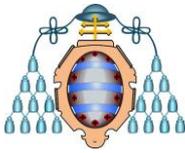


Figura 4.- Formaciones nerviosas espiroideas inmunorreactivas para la enolasa neuronal específica y la situadas en los septos conectivos de los músculos de la faringe. Enolasa neuronal específica. Magnificación original x20 (imágenes superior e inferior) y x40 (imagen central).



Las formaciones espiroideas también se han estudiado mediante tripe inmunofluorescencia y microscopía confocal. En el conjunto del aparato nervioso de la faringe este tipo de estructuras representan una parte muy pequeña (Figura 5, izquierda) pero morfológicamente son claramente diferenciables de los troncos nerviosos intramusculares. A mayores aumentos, y aunque en la imagen se precian en un solo plano, se puede apreciar que las formaciones espiroideas están formadas por un axón rodeado parcialmente por células de Schwann proteína S100 positivas, con trayecto flexuoso e inmersas en tejido conectivo (Figura 5, derecha). El análisis de reconstrucción sobre secciones gruesas permitió confirmar que se trata de elementos de largos recorridos e ininterrumpidos. En ningún caso se han observado fibras nerviosas con esta morfología que fueran inmunorreactivas exclusivamente para la enolasa o para la proteína S100.

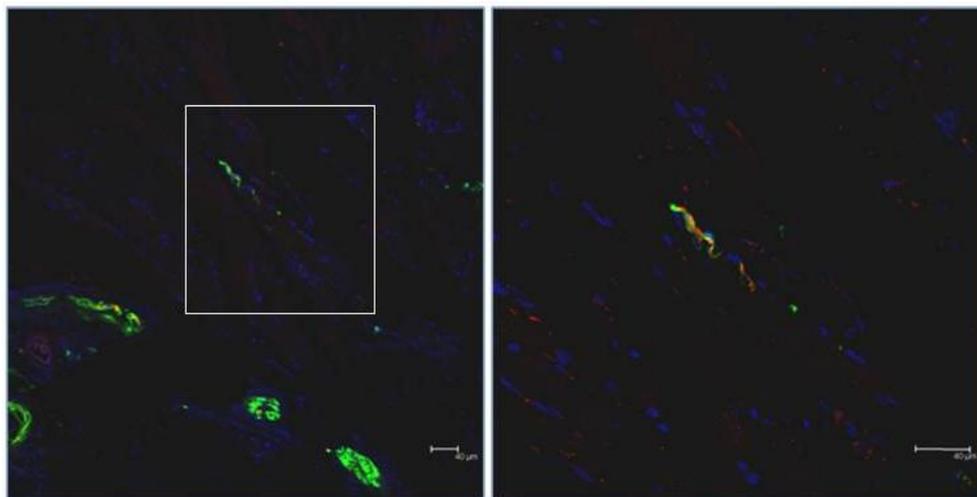
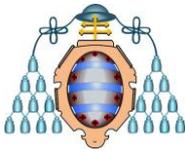


Figura 5.- Formaciones nerviosas espiroideas inmunorreactivas para la enolasa neuronal específica (rojo) y la proteína S100 (verde) situadas en los septos conectivos de los músculos de la faringe. La fluorescencia azul corresponde al DAPI, utilizado para marcar los núcleos celulares.

6.3. Distribución de las mecanoproteínas TRP y ASIC en la faringe humana

Algunos de los miembros de la superfamilia de canales iónicos TRP están relacionados con la mecanorrecepción. Se trata de las isoformas TRPA1, TRPC6, TRPM8, TRPV1 y TRPV4. De todas ellas, en la faringe humana se ha detectado inmunorreacción positiva y específica para TRPV4, TRPA1 y TRPC6. Pero de todas ellas, sólo TRPV4



mostró un patrón de distribución que asemeja al encontrado para las formaciones nerviosas sensitivas descritas en los apartados anteriores (Figura 6).



Figura 6.- Localización inmunohistoquímica de TRPV4 en la faringe humana. El patrón de inmunomarcaje es compatible con localización en los nervios sensitivos de la faringe. Magnificación original x20 (derecha) y x40 (izquierda).

Para tener la certeza de que, efectivamente se trata de elementos nerviosos, es necesario la realización de estudios de doble inmunomarcaje con anticuerpos anti TRPV4 y un marcador axónico.

Por lo que se refiere a las otras dos proteínas TRP que resultaron positivas, ambas se localizaron en elementos no nerviosos, sobre todo a nivel de las glándulas situadas en la submucosa de la bucofaringe (Figura 7).

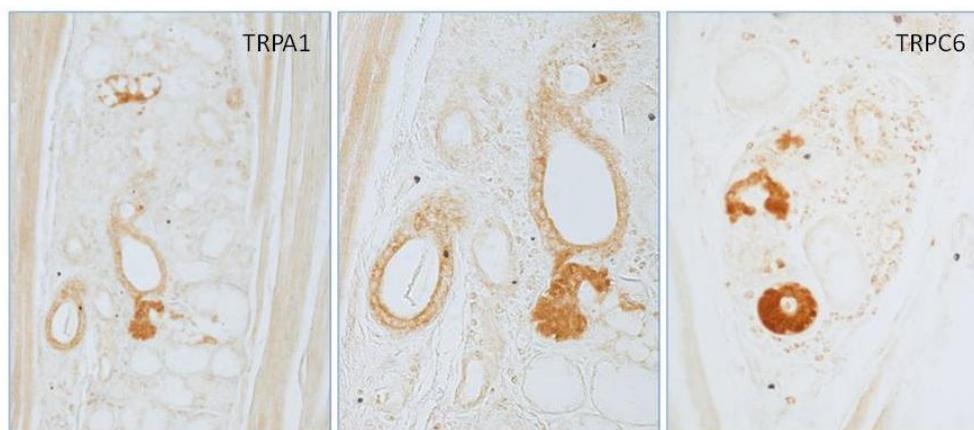
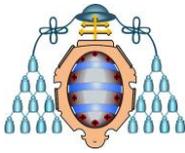


Figura 7.- Localización inmunohistoquímica de TRPA1 (imágenes izquierda y central) y TRPC6 (imagen derecha) en la faringe humana. El inmunomarcaje se localiza exclusivamente en las glándulas de la submucosa. Magnificación original x20 (izquierda y derecha) y x40 (centro).



Por otro lado, de las tres isoformas de ASIC analizadas sólo ASIC2 mostró inmunorreacción positiva, con un patrón de distribución muy amplio y complejo que incluye tanto elementos nerviosos como no nerviosos.



Figura 8.- Localización inmunohistoquímica de ASIC2 en la faringe humana. El patrón de inmunomarcaje es compatible con localización en los nervios y vasos de la faringe. Magnificación original x20 (izquierda y derecha) y x40 (centro).

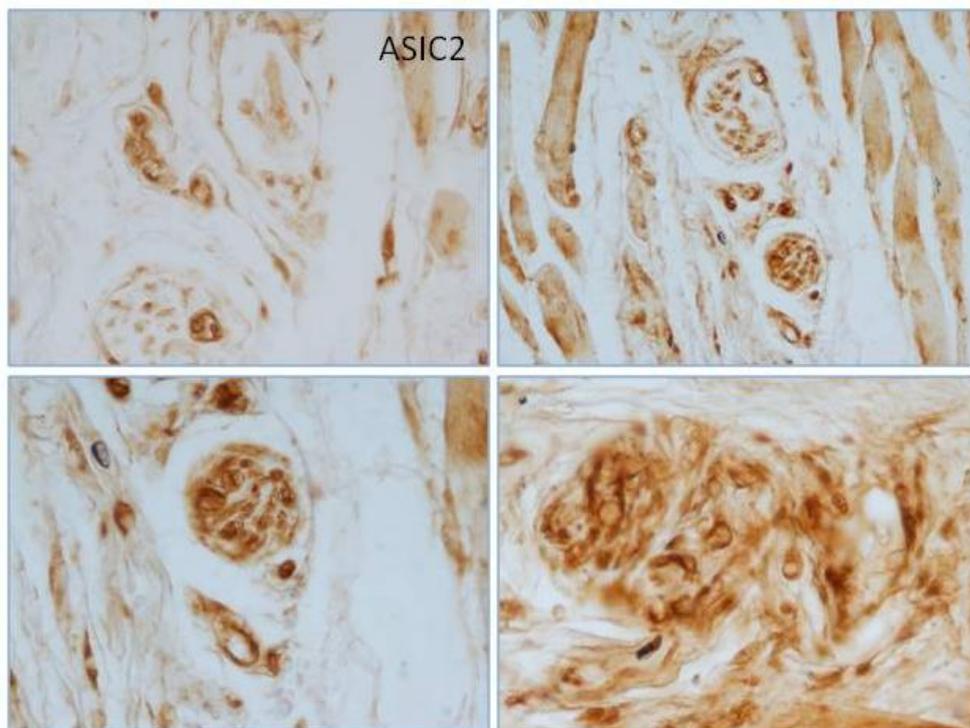
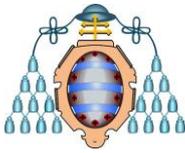


Figura 9.- Localización inmunohistoquímica de ASIC2 en la faringe humana. El patrón de inmunomarcaje es compatible con su localización en los nervios de la faringe, incluidas algunas formaciones nerviosas sensitivas. Magnificación original x20 (imágenes superiores e inferior izquierda) y x40 (inferior derecha).



El ASIC2 presenta un patrón de distribución bastante amplia que incluye algunas fibras musculares, los vasos sanguíneos y elementos dispuestos entre las fibras musculares identificables con nervios (Figura 7). Estudiando con detalle estos últimos elementos parecía que la inmunorreacción está presente tanto en axones como en células de Schwann de los troncos nerviosos, y que algunos elementos inmunorreactivos tienen el aspecto de formaciones nerviosas sensitivas (Figura 8). Son necesarios estudios más detallados de co-localización para poder corroborar esta afirmación.

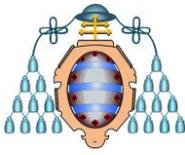


7. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación representa una continuación de estudios previos del laboratorio donde se realizó el trabajo y que ya han sido publicados como comunicación en el congreso nacional de anatomía del año 2011. Los objetivos de este trabajo y los precedentes es establecer el patrón de inervación propioceptiva de los músculos de faringe a nivel celular y molecular. Sorprendentemente, a pesar de la trascendencia funcional que tiene la faringe en la encrucijada digestivo-respiratoria, no existe ningún estudio detallado en la bibliografía.

La faringe es una parte esencial de la vía aérea superior, con una estructura compleja y funciones muy variadas. Y a diferencia de otras porciones de la vía aérea carece de esqueleto (como los cartílagos laríngeos o los anillos traqueales) lo que hace que sea colapsable con las implicaciones fisiológicas que ello conlleva. Para controlar y regular su permeabilidad la faringe posee un importante aparato nervioso, formado por un plexo dependiente de los nervios glossofaríngeo, vago, facial y simpático (el plexo faríngeo de Haller). De él parten las fibras nerviosas encargadas de la inervación motriz de los músculos, la inervación vegetativa de las glándulas y la inervación sensitiva de la mucosa y los músculos. El control de la musculatura faríngea es trascendental porque de él depende, en última instancia, la coordinación de los cambios en la forma y resistencia de la vía aérea superior, para asegurar el paso de alimentos, o del aire.

Además, como ya se expuso en detalle en el apartado de Estado actual del problema, la faringe es el punto de partida y ejecución de numerosos reflejos que los músculos faríngeos deben de ejecutar de manera correcta variando sus dimensiones (acortamiento-elongación) o modificando su tono. La detallada revisión sobre los reflejos faríngeos de Miller (2002) deja claro la importancia de la inervación motriz y sensitiva de la musculatura faríngea en ellos. La inervación motriz de la faringe humana, con las variaciones regionales de la misma y las diferencias relativas en la densidad de inervación de los distintos músculos es bastante bien conocida (Van Lunteren y Strohl, 1986; Mu y Sanders, 2007) cuya inervación motriz es bien conocida. Por el contrario son muy pocos

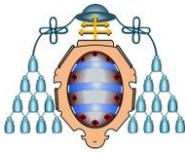


los estudios sobre la inervación sensitiva, algunos de ellos antiguos y realizados con técnicas inespecíficas (Seto, 1963) y otros centrados exclusivamente en las fibras intraepiteliales de la mucosa (Yoshida et al., 2000). En este sentido, es necesario realizar un estudio en detalle de la inervación sensitiva de la mucosa faríngea utilizando un número elevado de anticuerpos contra diferentes antígenos para poder establecer los patrones de inervación neuroquímicos del órgano. Sólo cuando se disponga de esta información se estará en condiciones de poder comprender muchos de los reflejos de la faringe y poder tratar los desórdenes de los mismos.

En nuestro trabajo no hemos identificado fibras nerviosas intraepiteliales, aunque sí algunos plexos nerviosos subepiteliales más o menos densos. Posiblemente las características de los anticuerpos utilizados, el tratamiento del material (fijado en formaldehído) y el espesor de las secciones se encuentren en la base de estos resultados y de la discrepancia con el trabajo de Yoshida et al. (2000).

Pero a lo que no hemos encontrado ninguna referencia bibliográfica es a la inervación propioceptiva de la faringe, a pesar de que los propioceptores del órgano deben de ser el origen de los reflejos profundos originados en los músculos faríngeos. Clásicamente se admite que los músculos faríngeos carecen de propioceptores clásicos, es decir, de husos neuromusculares aunque si se han encontrado en algunos otros músculos de la región (Winckler, 1964; Bossy y Vidic, 1967; Sengupta y Sengupta, 1978).

¿A qué puede ser debido este hecho diferencial respecto al resto de la musculatura estriada del cuerpo? Aunque el asunto ha sido muy poco estudiado, posiblemente guarde relación con la inervación de los músculos faríngeos. Según Lazarov (2007) la inervación propioceptiva de los músculos cérico-cefálicos depende del nervio trigémino. Como la faringe no recibe inervación de este nervio carecería de inervación propioceptiva clásica. No obstante, esta hipótesis debe de ser revisada en profundidad por lo que se refiere a los músculos faríngeos.



Con carácter general nuestros resultados coinciden plenamente con los de Lobato (2011) y Vega y Cols.. (2011) en lo que se refiere a los tipos de formaciones nerviosas sensitivas presentes en la musculatura faríngea humana. No se ha estudiado la inervación de la adventicia (donde los autores citados encuentran una amplia variedad de corpúsculos paciniformes) y tampoco se han encontrado microganglios vegetativos como comunican los citados trabajos y han demostrado otros estudios (Sbarbati y Osculati, 2007). Los diferentes morfotipos de formaciones nerviosas sensitivas de la faringe no pueden asimilarse a los que existen en otras localizaciones del cuerpo, especialmente en la piel, pero en muchos casos la morfología hace pensar en corpúsculos de tipo Ruffini-like, que son capaces de responder a la presión. Lo que está por establecer es si esos posibles mecanorreceptores con capaces de sustituir y cumplir las mismas funciones de los husos neuromusculares.

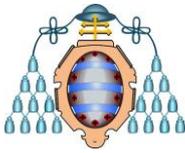
En el presente trabajo hemos confirmado la existencia en la faringe humana de unas formaciones nerviosas a las que atribuimos función propioceptiva y que denominamos formaciones sensitivas espiroideas por su morfología. Estas estructuras, previamente descritas por Lobato (2011) y Vega y Cols., (2011), tienen forma de muelle, están dispuestas entre las fibras musculares y siguen trayectos paralelos al eje mayor de los músculos. Por su disposición es posible hipotetizar que estas formaciones nerviosas se acortan o alargan en función de la actividad de los músculos de la faringe para desencadenar reflejos que adaptan el tono de los músculos faríngeos a una situación funcional concreta, o son el punto de partida de arcos reflejos que desarrollan músculos de regiones próximas. El tema aun no está agotado y seguramente será objeto de posteriores estudios.

Con el fin de profundizar en las bases moleculares de la propiocepción de la musculatura faríngea y de explorar si las formaciones nerviosas sensitivas encontradas pueden funcionar como mecanorreceptores, y por tanto también como propioceptores, se ha analizado la distribución de algunas mecanoproteínas en la faringe.



La mecanobiología puede definirse como la ciencia que estudia las propiedades mecánicas de las células y tejidos en base su estructura, su interferencia con las funciones biológicas y sus consecuencias fisiopatológicas. Actualmente se acepta la hipótesis de que las deformaciones en la membrana de los distintos tipos de células que forman los mecanorreceptores (axones, células de Schwann diferenciadas y fibroblastos) desencadenan la apertura de canales iónicos mecanosensibles que inician una despolarización, convirtiendo así el estímulo mecánico en una señal eléctrica. Por lo tanto, para actuar como mecanotransductoras las células de los mecanorreceptores deben de expresar los canales iónicos activados por la fuerza o el desplazamiento. Por otro lado, aunque la mayoría de los estudios realizados hacen especial hincapié en el papel de la membrana plasmática en la apertura de los canales iónicos, algunas estructuras intracelulares y/o extracelulares, como las proteínas del citoesqueleto y la matriz extracelular, también podrían estar implicadas en la mecanotransducción (ver Del Valle y Cols., 2012).

En los últimos años se han descubierto en los invertebrados una serie de canales iónicos que o son mecanotransductores per se o son necesarios para la mecanotransducción. Si además, esos canales, o parte de ellos, se localizan en el soma y/o los axones de las neuronas sensitivas mecánicas y en los mecanorreceptores que suplen, su implicación en los procesos de mecanosensación parece lógica. Hasta la fecha, existen evidencias experimentales de que miembros de cuatro familias de canales iónicos intervenir en los procesos de mecanotransducción. Son los DEG/ENaC, la de los canales de potencial de receptor transitorio (TRP), los canales de dos dominios de potasio (K2P; TERK1, TREK, TRAAK) y los canales MscS-like. En este trabajo hemos analizado exclusivamente las mecano proteínas TRP y ASIC (miembros de la familia de las DEG/ENaC) con supuesta función mecanorreceptora habiendo observado patrones morfológicos de localización de TRPV4 y ASIC2 compatibles con su presencia en nervios y formaciones nerviosas sensitivas. No obstante, esta afirmación se basa exclusivamente en criterios morfológicos y son necesarios estudios de co-localización con marcadores axónicos y gliales para poder ratificar definitivamente. En apoyo de nuestra interpretación está el hecho de que se hayan detectado estas proteínas en diferentes tipos de corpúsculos sensitivos en la rata, ratón y humano (ver Del Valle y Cols., 2012).



Estas observaciones abren un nuevo campo en el estudio de la propiocepción y mecanorrecepción faríngea, que necesita posteriores estudios de confirmación, y que sería deseable se extendiese a otros músculos estriados de la zona.

Los resultados del presente trabajo contribuyen de forma significativa al conocimiento de la inervación propioceptiva de los músculos de la faringe y en un sentido más amplio a la mecanobiología del órgano. No obstante, el estudio tiene una serie de limitaciones que conviene poner de manifiesto y que pueden ser la base para posteriores trabajos de investigación sobre el tema. En primer lugar el número de muestras disponibles fue limitado. Los estudios sobre material humano tienen la ventaja de que no necesitan extrapolarse desde el animal, pero adolecen por la escasez de material en buenas condiciones disponible. En segundo lugar sería deseable poder disponer de material de faringe procedente de las diferentes zonas de la misma, claramente identificadas y bien disecadas. Esto consentiría establecer si existen o no diferencias regionales claras tanto en la distribución de los mecano-propioceptores como en la expresión de las mecanoproteínas estudiadas. Por último, son necesarios ulteriores estudios de co-localización para establecer de forma definitiva los patrones de expresión de las mecanoproteínas, especialmente las que se localizan a nivel de los perfiles nerviosos. Sólo de esta manera se podrá determinar su papel en la mecanocepción.



8. CONCLUSIONES

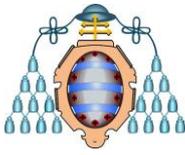
Tras el análisis de los resultados y la oportuna discusión de los mismos, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- 1.- Los músculos de la faringe humana carecen de husos neuromusculares.
- 2.- En el espesor del estrato muscular de la faringe humana hay diferentes morfotipos de formaciones nerviosas sensitivas, en muchos casos de tipo Ruffini-like, que en base a su morfología y organización pueden de ser identificados como mecanorreceptores.
- 3.- Se confirma la existencia en la musculatura faríngea humana de un tipo especial de formación nerviosa sensitiva, denominada espiroidea, que podría ser el sustituto de los husos neuromusculares como receptor propioceptivo.
- 4.- Las formaciones nerviosas de la faringe humana expresan las mecanoproteínas TRPV4 y ASIC2, lo que sugiere que efectivamente las formaciones nerviosas sensitivas de la musculatura faríngea humana son mecanorreceptores.

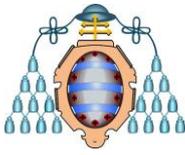


9. BIBLIOGRAFÍA

- Anantharam A, Palmer LG (2007). Determination of Epithelial Na⁺ Channel Subunit Stoichiometry from Single- Channel Conductances. *J. gen. Physiol* Vol 130 number 1, 55-70
- Árnadóttir J, Chalfie M (2010). Eukaryotic Mechanosensitive Channels. *Annu.Rev Biophys* 39:111-37
- Bangel- Ruland N, Sobczak K, Christmann T, Kentrup D, Lanhgorst H, Kusche- Vihrog K, Weber W (2009). Characterization of the Epithelial Sodium Channel δ - Subunit in Human Nasal Epithelium. *Am J Respir Cell Biol* Vol 42, 498-505
- Belmonte C, Viana F (2008). Molecular al cellular limits to somatosensoty specificity. *Molecular Pain*, 4:14
- Bosma JR, Donner MW, Tanaka W, Robertson D (1986). Anatomy of pharynx, pertinent to swallowing. *Dysphagia* 1:23-33.
- Bossy J, Vidić B (1967) Does proprioceptive innervation of the muscles of the pharynx exist in man? *Arch Anat Histol Embryol* 50:273-284.
- Brouillette RT, Thach BT (1980). A neuromuscular mechanism maintaining extrathoracic airway patency. *J Appl Physiol: Respir, Environ, Exer Physiol* 46:772-779.
- Calavia MG, Montaña JA, García- Suárez O, Feito J, Guervós MA, Germanà A, del Valle M, Pérez- Piñera P, Cobo J, Vega JA (2010). Differential localization of Acid- Sensing ion channels 1 and 2 in Human Cutaneous Pacinian Corpuscles. *Cell Mol Neurobiol* 30:841-848
- Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G (2005). International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and Structure- Function Relationships of Transient receptor potencial Channels. *Pharmacol Rev* 57:427-450.
- Davies AM, Koenig JS, Thach BT (1988). Upper airway chemoreflex responses to saline and water in preterm infants. *J Appl Physiol* 64:1412-1420.
- Del Valle M.E, Cobo T, Cobo J.L, Vega JA (2012). Mechanosensory neurons, Cutaneous mechanoreceters, and Putative mechanoproteins.*Microsc. Res. Tech* 00:000-000.



- Dijkink L, Hartog A, Van Os CH, Bindels RJN (2002). The epithelial sodium channel (ENaC) is intracellularly located as a tetramer. *Eur J Physiol* 444:549-555.
- Donner MW, Bosma JF, Robertson D (1985). Anatomy and physiology of the pharynx. *Gastrointest Radiol* 10:196-212.
- Drummond HA, Abboud FM, Welsh MJ (2000). Localization of β and γ subunits of ENaC in sensory nerve endings in the rat foot pad. *Brain Research* 884 1-12
- Eastwood PR, Satoh M, Curran AK, Zayas MT, Smith CA, Dempsey JA (1999). Inhibition of inspiratory motor output by high-frequency low-pressure oscillations in the upper airway of sleeping dogs. *J Physiol (Lond)* 517:259-271.
- Eid SR, Cortright DN (2009). Transient Receptor Potential Channels on Sensory Nerves. *Handbook of Experimental Pharmacology* 194, 10.1007/978-3-540-79090-7_8.
- Gillespie PG, Walker RG (2001). Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature*, vol 413.
- Karlsson JA, San'Ambrogio G, Widdicombe J (1988). Afferent neural pathways in cough and reflex bronchoconstriction. *J Appl Physiol* 65:1007-1023.
- Korpas J, Tomori Z (1979). Cough and other respiratory reflexes. Basel: Karger
- Kuehn DP, Templeton PJ, Maynard JA (1990) Muscle spindles in the velopharyngeal musculature of humans. *J Speech Hear Res* 33: 488-493.
- Lazarov NE (2007) Neurobiology of orofacial proprioception. *Brain Res Rev* 56:362-383
- Leder SB (1996). Gag reflex and dysphagia. *Head Neck* 18:138-141.
- Liedtke W (2005). TRPV4 as osmosensor: a transgenic approach. *Eur J Physiol* 451:176-180
- Lim CT, Bershadsky A, Sheetz MP (2010). Mechanobiology. *J.R.Soc.* 7 S291-S293.
- Lingueglia E (2007). Acid-sensing Ion Channels in Sensory perception. *J Biol Chem* Vol 282, 24:17325-17329.
- Liss JM (1990) Muscle spindles in the human levator veli palatini and palatoglossus muscles. *J Speech Hear Res* 33:736-746.



Lobato M (2011). La propiocepción en el músculo constrictor de la faringe. Trabajo Fin de Máster Ortondoncia y Ortopedia dentofacial Universidad de Oviedo.

Lumpkin EA, Caterina MJ (2007). Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature*, vol 445.

Mano I, Driscoll M (1999). DEG/ENaC channels: a touchy superfamily that watches its salt. *BioEssays* 21:568-578.

Meltzer RH, Kapoor N, Qadri YJ, Anderson SJ, Fuller CM, Benos DJ (2007). Heteromeric assembly of acid-sensitive ion channel and epithelial sodium channel subunits. *J Biol Chem.* 31;282(35):25548-59.

Miller AJ. 2002. Oral and pharyngeal reflexes in the mammalian nervous system: their diverse range in complexity and the pivotal role of the tongue. *Crit Rev Oral Biol Med* 13:409-425.

Mu L, Sanders I (2007) Neuromuscular specializations within human pharyngeal constrictor muscles. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 116:604-617.

Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA (2007). Transient Receptor Potential Cation Channels in Disease. *Physiol Rev* 87:165-217.

Perlman AL, Luschei ES, Du Mond CE (1989). Electrical activity from the superior pharyngeal constrictor during reflexive and nonreflexive tasks. *J Speech Hear* 32:749-754.

Pierce RJ, Worsnop CJ (1999). Upper airway function and dysfunction in respiration. *Clin Exp Pharm Physiol* 26:1-10.

Pommerenke WT (1928). A study of the sensory areas eliciting the swallowing reflex. *Am J Physiol* 84:36-41.

Roberts MW, Tylenda CA, Sonies BC, Elin RJ (1989). Dysphagia in bulimia nervosa. *Dysphagia* 4:106-111.

Sbarbati A, Osculati F (2007). Extending the enteric nervous system. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 61 377-382.

Sengupta BN, Sengupta S (1978) Muscle spindles in the inferior constrictor pharyngis muscle of the crab-eating monkey (*Macaca irus*). *Acta Anat (Basel)* 100(1):132-135.



Seto H (1963) Sensibility of de digestive organs (Chaper 8). In: Studies on the sensory innervation (Human sensibility). Igoku Shoin Ltd, Tokyo, pp. 104-217.

Shimokawa T, Yi SQ, Izumi A, Ru F, Akita K, Sato T, Tanaka S (2004) An anatomical study of the levator veli palatini and superior constrictor with special reference to their nerve supply. *Surg Radiol Anat* 26:100-105.

Stewart AP, Haerteis S, Diakov A, Korbmacher C, Edwardson JM (2011). Atomic force microscopy reveals the architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *J Biol Chem*. Sep 16;286(37):31944-52.

Valley MA, Kallo AN, Curry CS (1992). Perioral pharyngeal block for placement of esophageal endoprotheses. *Regional Anesth* 17:102-106.

Van de Graaff WB, Gottfried SB, Mitra J, van Lunteren E, Cherniack NS, Strohl KP (1984). Respiratory function of hyoid muscles and hyoid arch. *J Appl Physiol* 57:197-204.

Van Lunteren E, Strohl KP (1986). The muscles of the upper airways. *Clin Chest Med Jun*;7(2):171-88.

Vega JA, De Carlos F, García-Suárez O, Calavia MG, Álvarez- Suárez A, López-Muñiz A, Cobo J (2011). Inervación sensitiva de los músculos constrictores de la faringe humana. Comunicación al XXV Congreso de la Sociedad Anatómica española.

Vega JA, Haro JJ, Del Valle ME (1996). Immunohistochemistry of Human Cutaneous Meissner and pacinian Corpuscles. *Microsc Res Tech* 34:351-361

Vogel V, Sheetz M (2006). Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nature* vol 7 265-275.

Wang B, Danjo A, Kajiya H, Okabe K, Kido MA (2011). Oral epithelial cells are activated via TRP channels. *J Dent Res* 90:163

Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M. (1997). A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* 386, 173–177.

Winckler G (1964). The neural apparatus of the tensor veli palatine muscle. *Arch Anat Histol Embryol*. 47:311-6.



Yamamura K, Mostafaezur RM, Kurose M, Yamada Y (2008).Mastication –induced modulation of the jaw –opening réflex Turing different periods of mastication in awake rabbits. Brain Research 1254 28-37.

Yoshida Y, Tanaka Y, Hirano M, Nakashima T. (2000). Sensory innervation of the pharynx and larynx. Am J Med 108 Suppl 4a:51S-61S.

Zelena J, Jirmanova I, Lieberman A.R (1994). Reinnervation of Pacician corpuscles by CNS axons alter transplantation to the dorsal column: incidence and ultrastructure.Journal of Neurocology 23, 422-432