



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

PROGRAMA DE DOCTORADO
CIENCIAS DE LA SALUD

Tesis Doctoral

**PROPICEPTORES CEFALICOS: IDENTIFICACION
BASADA EN LA EXPRESION DE Piezo2**

Sonsoles Junquera Olay

Oviedo 2019

UNIVERSIDAD DE OVIEDO
PROGRAMA DE DOCTORADO
MORFOLOGÍA Y BIOLOGÍA CELULAR

Tesis Doctoral

**PROPICEPTORES CEFALICOS: IDENTIFICACION
BASADA EN LA EXPRESION DE Piezo2**

Sonsoles Junquera Olay

Directores

**Juan C. de Vicente Rodríguez
Juan L. Cobo Díaz**

Oviedo 2019



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis Doctoral	
Español: PROPICEPTORES CEFALICOS: IDENTIFICACION BASADA EN LA EXPRESION DE Piezo2	Inglés: CEPHALIC PROPRIOCEPTORS: IDENTIFICATION BASED ON THE EXPRESSION OF Piezo2
2.- Autor	
Nombre:	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: CIENCIAS DE LA SALUD	
Línea de Investigación:	
Órgano responsable: CENTRO INTERNACIONAL DE POSTGRADO	

RESUMEN (en español)

Introducción.- Los músculos cefálicos están inervados sensitivamente por diferentes nervios craneales (facial, trigémino, glosofaríngeo, vago e hipogloso). Sin embargo, a diferencia de la sensibilidad somatosensorial general, la inervación propioceptiva depende exclusivamente del nervio trigémino, el cual garantiza la inervación de todos ellos mediante abundantes comunicaciones con el resto de los pares craneales. Por otro lado, los músculos cefálicos, salvo los inervados por el trigémino, carecen de propioceptores típicos, es decir, de husos neuromusculares por lo que es plausible que existen estructuras sensitivas que los sustituyan (propioceptores atípicos). De cualquier forma, la presencia en los terminales nerviosos de los propioceptores típicos y atípicos de la mecanoproteína Piezo2, y en menor medida de ASIC2, es condición suficiente para identificarlos como propioceptores funcionantes.

Hipótesis y objetivos.- Los músculos cefálicos realizan movimientos finos que requieren ajustes permanentes del tono muscular y, por tanto, tienen que poseer mecanorreceptores-proprioceptores al inicio de los arcos nerviosos responsables de los mismos. El **objetivo general** del estudio es contribuir al conocimiento de las bases de la propiocepción cefálica. Los **objetivos específicos** son los siguientes: 1) Estudiar y clasificar los tipos de propioceptores en los músculos cefálicos humanos correspondientes al territorio de los nervios trigémino, facial, glosofaríngeo, vago e hipogloso; 2) Establecer la densidad relativa de propioceptores en los músculos cefálicos humanos analizados; 3) Determinar los patrones de expresión de la mecanoproteína Piezo2 en los propioceptores cefálicos y la posible co-localización con la mecanoproteína ASIC2; y 4) Analizar la presencia de mecanorreceptores atípicos en los músculos inervados por el nervio trigémino en ratones deficientes en el sistema NT-3/TrkC.

Material y técnicas.- Se utilizó material humano y de ratón. El material humano procedía de cadáveres y piezas cadavéricas criopreservadas, no fijadas, y de piezas de necropsias, correspondientes a 10 varones y 7 mujeres, de edades comprendidas entre los 46 y 83 años. Se estudiaron los siguientes músculos: 1) territorio del n. trigémino: masetero, perigoideo externo,

milohiideo, vientre anterior del digástrico y tensor del velo del paladar; 2) territorio del n. facial: orbicular de los labios, orbicular de los párpados, cigomáticos mayor y menor, elevador del labio superior y platisma del cuello; 3) territorio del nervio hipogloso: geniogloso; territorio n. glossofaríngeo y vago: músculo de la úvula, palatogloso, constrictor superior de la faringe y constrictor medio de la faringe. Como controles positivos en todos los procesos se incluyeron muestras de piel de los pulpejos de los dedos (Registro Nacional de Biobancos, Sección colecciones, Ref. C-0001627) y el estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Biomédica del Principado de Asturias, España (Cod. CELm, PAs: Proyecto 266/18). Todo el material se obtuvo de acuerdo con la legislación española (RD 1301/2006; Ley 14/2007; DR. 1716/2011; Orden ECC 1414/2013) y las directrices de la Declaración II de Helsinki. En el estudio sobre ratón se incluyeron ratones de genotipo salvaje, heterocigotos y homocigotos para mutaciones no funcionales en los genes que codifican para NT-3 y su receptor TrkC. Las técnicas realizadas incluyen estudios estructurales (hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson), de inmunohistoquímica indirecta para la detección de las proteínas S100 y del neurofilamento, Piezo2 y ASIC2, y de doble inmunofluorescencia para co-localizar Piezo2 + ASIC2. Finalmente se determinó la densidad de propioceptores típicos y atípicos, así como la expresión y/o co-expresión de las dos mecanoproteínas. En el material de ratón se realizaron únicamente estudios estructurales y ultraestructurales.

Resultados.- Humanos: se localizaron husos neuromusculares estructuralmente identificables en los músculos inervados por el nervio trigémino, excepto el elevador del velo del paladar, y en el músculo geniogloso, correspondiente al n. hipogloso. La mayor densidad de husos neuromusculares correspondió a los músculos masetero y pterigoideo externo. En el resto de los músculos analizados se detectaron propioceptores atípicos correspondientes a los 3 tipos de la clasificación de Cobo et al. (2019), con proporciones relativas variables entre cada uno de ellos. En los músculos de la faringe y velo del paladar los propioceptores presentar morfologías muy variables siendo típicas de los músculos constrictores de la faringe las formaciones espiroideas. En cuanto a la expresión de las mecanoproteínas, en la mayoría de los husos neuromusculares se han detectado tanto Piezo2 como ASIC2 y en las formaciones propioceptoras atípicas proporciones altas, pero no absolutas, de ellas, predominando siempre Piezo2; en más de la mitad de estas formaciones se observó co-localización de Piezo2 y ASIC2.

Ratón: en los animales deficientes en NT3, estudiados en el momento del nacimiento, no se encontraron husos neuromusculares; en los animales deficientes en TrkC, estudiados a los 7 y 15 días de vida, se encontraron husos neuromusculares normales en los animales de genotipo salvaje y heterocigotos, mientras que en los homocigotos los husos estaban en menor densidad, eran de menor tamaño y mostraban signos de degeneración. No se observaron formaciones nerviosas sensitivas sustitutas de los husos neuromusculares en los animales portadores de las mutaciones.

Conclusiones.- Solo los músculos del territorio del nervio trigémino humano tienen husos neuromusculares que son sustituidos por propioceptores atípicos en el resto de los músculos cefálicos estudiados. Todas estas estructuras están suplidas por fibras nerviosas que expresan la mecanoproteína Piezo2 y en menor medida ASIC2, co-localizándose ambas en muchos casos.

RESUMEN (en Inglés)

Introduction.- The cephalic muscles are supplied sensitively by different cranial nerves (facial, trigeminal, glosopharyngeal, vagus and hypoglosse). However, unlike general somatosensory sensitivity, proprioceptive innervation depends exclusively on the trigeminal nerve, which ensures the innervation of all of them through abundant communications with those cranial nerves. On the other hand, the cephalic muscles, except those supplied by the trigeminal, lack typical proprioceptors, that is, muscle spindles. So, it is plausible that there are sensitive structures that replace them (atypical proprioceptors). In any case, the presence in the typical and atypical nerve terminals of the mechanoprotein Piezo2, and to a lesser extent ASIC2, is a sufficient condition to identify them as functioning proprioceptors.

Hypothesis and objectives.- The cephalic muscles perform fine movements that require permanent adjustments of muscle tone and, therefore, have to possess mechanoreceptors-proprioceptors at the beginning of the nerve arches responsible for them. The **main objective** of the study is to contribute to the knowledge of the basis of cephalic proprioception. The **specific objectives** are as follows: 1) Study and classify the types of proprioceptors in human cephalic muscles corresponding to the territory of the trigeminal, facial, glosopharyngeal, vagus and hypoglosse nerves; 2) Establish the relative density of proprioceptors in the human cephalic muscles analyzed; 3) Determine the expression patterns of Piezo2 mechanoprotein in cephalic proprioceptors and the possible co-location with the ASIC2 mechanoprotein; and 4) Analyze the presence of atypical mechanoreceptors in the muscles supplied by the trigeminal nerve in mice deficient in the NT-3/TrkC system.

Material and techniques.- Human and mouse material was used. Human material came from cryopreserved cadaveric pieces, unfixed, and from pieces of necropsies, corresponding to 10 males and 7 women, aged between 46 and 83 years. The following muscles were studied: 1) territory of the trigeminal n: masseter, pterygoideus laterales, mylohyodeus, venter of anterior digastric muscle, and tensor veli palatini; 2) territory of the facial n.: orbicular of the lips, orbicular of the eyelids, major and minor zygomatic muscles, upper lip lift and neck platism; 3) territory of the hypoglossous nerve: genioglossus muscle; 4) Territory n. glossopharyngeal and vagus: uvula muscle, palatoglosse, upper pharynx constrictor and lower pharynx constrictor. Positive controls in all processes included digital skin samples (National Biobank Registry, Collections Section, Ref. C-0001627) and the study was approved by the Ethical Committee for Biomedical Research of the Principality of Asturias, Spain (Cod. CEIm, PAst: Project 266/18). All the material was obtained in accordance with Spanish legislation (RD 1301/2006; Law 14/2007; DR. 1716/2011; ECC Order 1414/2013) and the guidelines of the Helsinki Declaration II. The mouse study included wild type, heterozygote and homozygous mice for nonfunctional mutations in the genes encoding for NT-3 and its TrkC receptor. Techniques performed include structural studies (hematoxylin-eosin and Masson trichromic), indirect immunohistochemistry for the detection of S100 and neurofilament proteins, Piezo2 and ASIC2, and double immunofluorescence for co-locating Piezo2 + ASIC2. Finally, the density of typical and atypical proprioceptors, as well as the expression and/or co-expression of the two mechanoproteins, was determined. Only structural and ultrastructural studies were carried out on the mouse material.

Results.- Human: structurally identifiable neuromuscular spindles were located in the muscles innervated by the trigeminal nerve, except the elevator of the palate veil, and in the genioglossous muscle, corresponding to the hypoglosse nerve. The highest density of neuromuscular spindles

corresponded to the external masetero and pterigoid muscles. In the rest of the muscles analyzed, atypical propioceptors corresponding to the 3 types of the Cobo et al classification were detected. (2019), with varying relative proportions between each of them. In the muscles of the pharynx and veil of the palate the propioceptors present very variable morphologies being typical of the constrictor muscles of the pharynx the spiroidal formations. As for the expression of mechanoproteins, in most neuromuscular spindles both Piezo2 and ASIC2 have been detected and in the atypical proprioceptive formations high proportions, but not absolute, of them, always predominantly Piezo2; in more than half of these formations co-location of Piezo2 and ASIC2 was observed. **Mouse:** in NT3-deficient animals, studied at birth, no neuromuscular spindles were found; in animals deficient in TrkC, studied at 7 and 15 days of life, normal neuromuscular spindles were found in animals of wild and heterozygous genotype, while in homozygous the spindles were in lower density, were smaller in size and showed signs of smaller density, were smaller and showed signs of lower density, were smaller and showed signs of lower density, were smaller and showed signs of lower density, were smaller and showed signs of lower density and showed signs of lower density, Degeneration. No sensitive tissue nerve formations of neuromuscular spindles were observed in animals carrying mutations.

Conclusions.- Only the muscles of the territory of the human trigeminal nerve have neuromuscular spindles that are replaced by atypical propioceptors in the rest of the cephalic muscles studied. All these structures are supplemented by nerve fibers that express the mechanoprotein Piezo2 and to a lesser extent ASIC2, co-locating both in many cases.

DEDICATORIA

A mis padres. Nunca me han dejado sola. Siento su cariño todos los días

AGRADECIMIENTOS

A mis Directores, los Profesores. Juan Carlos de Vicente Rodríguez y Juan Luis Cobo Díaz. Su generosidad me ha permitido compartir la línea de investigación que pusieron en marcha en el año 2016. Su ejemplo me ha permitido conocer lo que debe representar la Universidad en el ejercicio de la medicina clínica. Sin su paciencia y apoyo este trabajo no se habría realizado.

Al Profesor José Antonio Vega Álvarez. Sin su energía, inteligencia, brillantez y capacidad de organización estaría perdida. Me hizo conocer su “mundo” con el trabajo de fin de grado y me instó a que no lo abandonara. Los corpúsculos de Meissner y Pacini, la Piezo2, la propiocepción, la amistad y la entrega generosa a los amigos, ya forman parte de mi vida.

A todos los que trabajan día a día en el laboratorio del Grupo de Investigación *SINPOs* de la Universidad de Oviedo. Gracias a su meticuloso trabajo, se hace investigación.

A mis compañeros del Servicio de Radiología del Hospital Universitario de Santiago de Compostela. Por su apoyo, he podido dedicar parte de mi tiempo a esta tarea. Siempre me han hecho partícipes de su amistad.

Índice

- 1.- Introducción, 21
- 2.- Estado actual del problema
 - 2.1. Propiocepción, 27
 - 2.2. El problema de la propiocepción cefálica, 28
 - 2.3. Propioceptores típicos y atípicos en los músculos cefálicos, 30
 - 2.4. Bases moleculares de la propiocepción, 32
 - 2.5. Piezo2 y propiocepción, 33
 - 2.5.1. Piezo2, 33
 - 2.5.2. Distribución de Piezo2 en mecanorreceptores, 35
 - 2.5.3. Piezo2 en husos neuromusculares, 36
- 3.- Hipótesis de trabajo y Objetivos, 39
- 4.- Material y Técnicas, 41
 - 4.1. Material, 41
 - 4.1.1. Material humano, 45
 - 4.1.2. Material de ratón, 48
 - 4.2. Técnicas, 48
 - 4.2.1. Técnicas estructurales, 48
 - 4.2.2. Técnicas de inmunohistoquímicas, 49
 - 4.2.3. Técnicas de inmunofluorescencia, 50
 - 4.2.4. Microscopía electrónica, 51
 - 4.2.5. Análisis cuantitativo, 52
- 5.- Resultados, 55
 - 5.1. Presencia de propioceptores típicos en los músculos cefálicos, 55
 - 5.2. Identificación morfológica de propioceptores atípicos en músculos cefálicos, 56
 - 5.3. Expresión y co-expresión de mecanoproteínas en los propioceptores de los músculos cefálicos, 60
 - 5.4. Husos neuromusculares en ratones deficientes en NT-3 y TrkC, 67
- 6.- Discusión,
 - 6.1. Consideraciones generales, 73
 - 6.2. Los propioceptores cefálicos
 - 6.3. Mecanoproteínas y propiocepción
 - 6.4. Limitaciones del estudio y futuras investigaciones
- 7.- Conclusiones

8.- Bibliografía

Anexo 1 – Curriculum vitae

Anexo 2 – Publicaciones relacionadas con la Tesis

1. Introducción

1. INTRODUCCION

La propiocepción es una cualidad de somatosensibilidad que informa al sistema nervioso central sobre la estática y la dinámica de los músculos y las articulaciones. Este tipo de sensibilidad ha sido muy estudiado en los músculos dependientes de los nervios espinales y en la actualidad se conocen bien las estructuras nerviosas implicadas en ella (Dijkerman y de Haan, 2007; Butler et al., 2016; Blecher et al., 2018). Por el contrario, las bases anatómicas, celulares y moleculares de la propiocepción de los músculos cefálicos son muy poco conocidas, aunque es evidente que estos músculos desarrollan permanentemente importantes y finos ajustes de estiramiento y tono en los movimientos faciales, regulación de la fuerza masticatoria, comportamientos oromotores y comunicación facial no verbal, reflejos orofaciales relacionados con el habla, la deglución, la tos, el vómito o la respiración (Miller, 2002; Cattaneo y Pavesi, 2014; Frayne et al., 2016).

El primer asunto sin resolver en la propiocepción cefálica es si todos los nervios craneales que inervan músculos esqueléticos recogen también la inervación propioceptiva de los mismos. Según Lazarov (2007) la inervación propioceptiva de todos los músculos cefálicos depende, exclusivamente, del nervio trigémino. Dicho en otras palabras: ni las neuronas sensitivas periféricas de los ganglios sensitivos de los pares craneales ni los núcleos sensitivos centrales de terminación de las fibras aferentes de los pares craneales diferentes al trigémino, procesan la información propioceptiva que se origina en su territorio muscular periférico cefálico. Además, es bien conocido que las neuronas propioceptivas del territorio del trigémino se localizan en el núcleo

mesencefálico del mismo y no en el ganglio del trigémino (Yoshida et al., 2017) y no se conoce si los ganglios sensitivos periféricos de los nervios facial, glossofaríngeo y vago tienen o no neuronas propioceptivas. Aunque es posible que su existencia no sea necesaria y que se sean siempre axones de neuronas trigeminales los que alcanzan los propioceptores cefálicos por las uniones del nervio trigémino con el resto de los pares craneales (ver Diamond et al., 2011; Shoja et al., 2014).

El segundo aspecto pendiente de resolver en este tema es la identificación de los propioceptores de los músculos cefálicos. En los músculos esqueléticos inervados por los nervios espinales los propioceptores están representados por órganos especializados de dos tipos: los husos neuromusculares y los órganos tendinosos de Golgi, además de otros tipos de corpúsculos con menor entidad funcional (Heppelmann, 1997; Banks, 2015; Bewick y Banks, 2015; Ackermann et al., 2016). Pero en los músculos cefálicos sólo los músculos masticadores inervados por la rama mandibular del trigémino y el músculo *platysma colli* contienen husos neuromusculares (Scutter y Türker, 2001; Osterlund et al., 2011; May et al., 2018). Por lo tanto, los propioceptores cefálicos, si existen, tienen que estar representado por otras formaciones nerviosas sensitivas distintas a los husos neuromusculares. Estudios recientes, usando técnicas de inmunohistoquímica asociadas a marcadores propios de la mecanotransducción han permitido poner de manifiesto que los músculos faciales (Cobo, 2016; Cobo et al., 2017) y algunos músculos de la faringe (De Carlos et al., 2013) poseen estructuras nerviosas sensitivas diferenciadas que presumiblemente podrían sustituir a los propioceptores. Pero estos trabajos son fragmentarios y no existe ningún estudio que analice de forma sistemática estas estructuras en los territorios musculares

de todos los pares craneales. No obstante, no se puede descartar que otras fibras nerviosas sensitivas que alcanzan los músculos (especialmente las nociceptivas) puedan funcionar como mecanorreceptores-propioceptores (ver Ackerley y Watkins, 2018).

Para tratar de aclarar en parte segundo aspecto de la propiocepción cefálica, en el presente trabajo de tesis doctoral se han estudiado dos modelos murinos modificados genéticamente que no desarrollan husos neuromusculares, los animales deficientes en neurotrofina-3 (NT-3) y en su receptor de alta afinidad TrkC (Fariñas et al., 1994; Oakley et al., 1995, 1997) si bien existen algunas controversias en el caso de los músculos masticadores (Kucera et al., 1998; Matsuo et al., 2000). Sería interesante ver si estos animales carentes de husos neuromusculares tienen otras formaciones nerviosas sensitivas capaces de sustituirlos.

Y, en tercer lugar, no se conoce cuáles son las bases moleculares de la mecanotransducción en los propioceptores de los músculos cefálicos. En los últimos años se ha puesto de relieve el papel de un canal iónico, Piezo2, como proteína mecanotransductora esencial para la propiocepción (Woo et al., 2015; Florez-Paz et al., 2016; Anderson et al., 2018; Kröger, 2018). Pero en los husos neuromusculares también se han detectado otras mecanoproteínas que participan o son requeridas para la mecanotransducción propioceptiva, como las proteínas ASIC (acid-sensing ion channels; Gautam y Benson, 2009; Simon et al., 2010; Chen y Wong, 2013; Lee y Chen, 2018). Por ello puede ser de interés conocer si los husos neuromusculares típicos y los propioceptores atípicos de los músculos cefálicos expresan y/o co-expresan las mecanoproteínas que actualmente se consideran implicadas en la mecanotransducción.

En esta tesis doctoral se ha abordado el estudio de la propiocepción de los músculos cefálicos humanos mediante es estudio morfológico e inmunohistoquímico de las formaciones nerviosas sensitivas presentes en ellos.

2. Estado actual del problema

2. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

2.1. Propiocepción

La propiocepción es una forma de mecanosensibilidad y se puede definir como la información inconsciente que llega al sistema nervio central sobre el estiramiento y la tensión de músculos, tendones, piel y articulaciones. La sensibilidad mecánica requiere que las fuerzas actúen sobre el sensor. Consecuentemente, las vías nerviosas que la conducen al sistema nervioso central se inician en los propioceptores, suplidos por los axones de neuronas mecanosensibles especializadas localizadas en los ganglios sensitivos (raquídeos y de los pares craneales; (Proske y Gandevia, 2012; Bewick y Banks, 2015). La información codificada por los propioceptores da origen a sensaciones inconscientes, y también conscientes, necesaria para la mayoría de las funciones motoras básicas (Akay et al., 2014).

Los propioceptores están representados por los husos neuromusculares y los órganos tendinosos de Golgi (**Figura 2.1**) que responden a los cambios en la longitud o la tensión de los músculos esqueléticos. Además, una serie de estudios recientes *in vivo* los implican en el mantenimiento de la alineación de la columna vertebral o en la realineación de los huesos fracturados. Estos descubrimientos se han hecho en varias líneas de ratón carentes de mecanosensores funcionales en parte o completamente (Blecher et al., 2018). Para los interesados en una revisión reciente y en detalle sobre ambos tipos de propioceptores, remitimos a los trabajos de Vega (1999), Kistemaker et al. (2013), Banks et al. (2015), Ellaway et al. (2015), Proske et al. (2015)

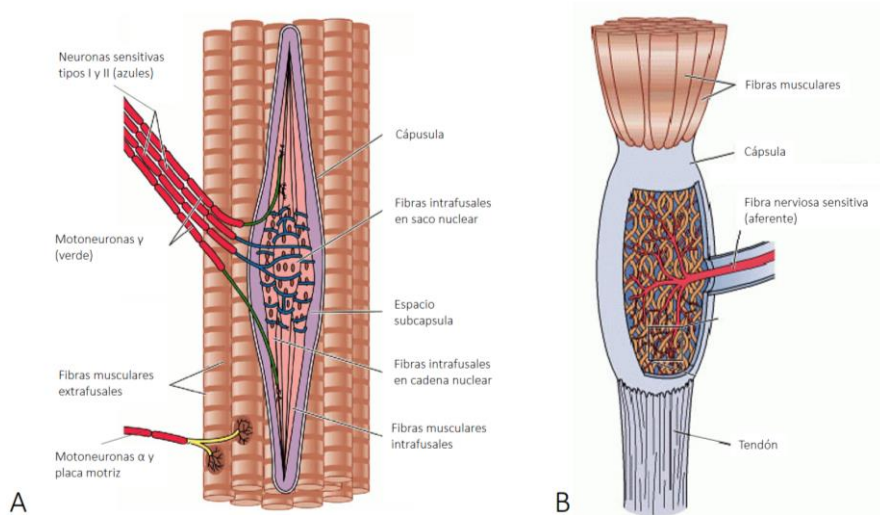


Figura 2.1.- Representación esquemática de la estructura de un huso neuromuscular (A) y un órgano tendinoso de Golgi (B) con los tipos de fibras nerviosas que lo inervan. Las imágenes fueron tomadas de las referencias incluidas en la webgrafía.

2.2. El problema de la propiocepción cefálica

La propiocepción involucra a todos los músculos esqueléticos, incluidos los músculos cefálicos, que contienen un sistema mecanosensorial intrínseco, el sistema propioceptivo, para informar al sistema nervioso central sobre las condiciones estáticas y dinámicas de las articulaciones y los músculos.

De todos los músculos cefálicos, hasta la fecha, solo se han identificado propioceptores típicos, es decir husos neuromusculares, en los inervados por el nervio trigémino (Saverino et al., 2014), mientras que en el resto del territorio de los pares craneales están ausentes (ver Cattaneo y Pavesi, 2014).

Ya hace algunas décadas Baumel (1974) sugirió que los impulsos propioceptivos de los músculos faciales se transmiten al sistema nervioso central a través de diferentes ramas trigémino, hecho que Lazarov (2007) extendió posteriormente a todos los músculos cefálicos.

El trigémino vehicula la propiocepción de los músculos cefálicos a través de neuronas del núcleo mesencefálico debido a las numerosas conexiones anastomosis entre este nervio y los diferentes pares craneales. Las mejor conocidas son las uniones que se establecen entre el nervio trigémino con el nervio facial. La revisión llevada a cabo por Hwang et al. (2015) muestra que en estudios cadavéricos que la mayor frecuencia de comunicación es con la rama maxilar (95,0% a 8,0%), seguida de la rama mandibular (76,7% a 38,5%) y la oftálmica (33,8% a 19,5%). Sin embargo, utilizando métodos de impregnación nerviosa, las comunicaciones alcanzan el 100% para las ramas mandibular y maxilar y el 85,7% para la oftálmica (Yang et al., 2013; ver para una revisión Cobo et al., 2017b, 2019). Por otro lado, el nervio facial recibe fibras propioceptivas procedentes de los nervios cervicales (65,2 a 43,5%; Hwang et al., 2015), así como con el nervio auriculotemporal (Namking et al., 2004; Kwak et al., 2004). También se han encontrado de forma regular conexiones entre el tronco del nervio facial y el gran nervio auricular (compuesto por ramas de los nervios espinales C2 y C3) (Yang et al., 2015), así como entre el nervio cervical transverso (C2 y C3) y la rama cervical del nervio facial (Brennan et al., 2017).

Aparte de las comunicaciones nerviosas mencionadas, no se ha encontrado en la revisión bibliográfica efectuada ninguna referencia a las uniones entre el nervio trigémino con los nervios glossofaríngeo, vago, espinal e hipogloso. Ello hace pensar que las fibras propioceptivas del territorio muscular de estos nervios pasan del trigémino a ellos en los propios órganos diana (lengua, faringe, paladar) o por medio de sus anastomosis con el nervio facial (Diamond et al., 2011; Shoja et al., 2014a y b) (**Figura 2.2**).

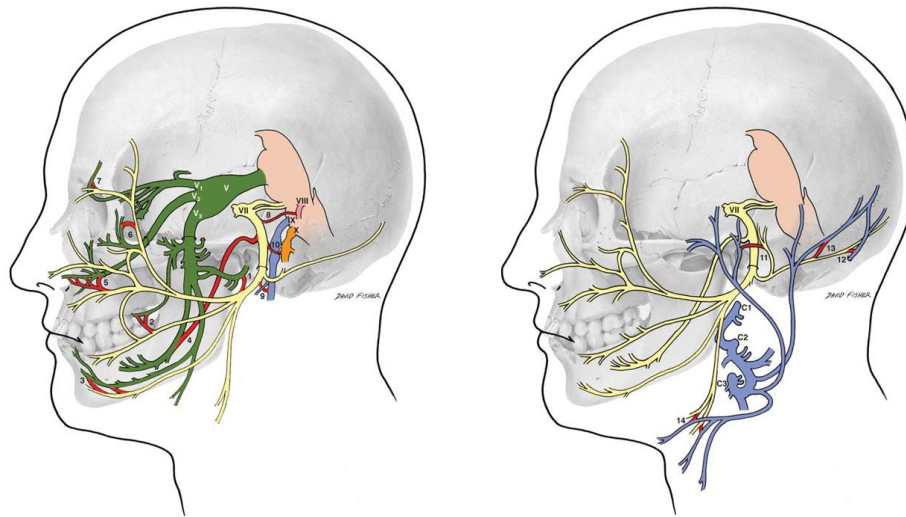


Figura 2.2.- Representación esquemática de las uniones del nervio facial con el nervio trigémino (izquierda) y con ramos espinales cervicales (derecha). Tomada de Diamond et al. (2011).

2.3. Propioceptores típicos y atípicos en los músculos cecálicos

Por lo que se refiere a los propioceptores de los músculos cefálicos los datos son igualmente controvertidos. Es bien conocido que los músculos faciales están desprovistos de propioceptores típicos y, por lo tanto, los movimientos faciales carecen de un sistema de retroalimentación propioceptivo convencional, que puede ser sólo en parte vicariado por aferentes cutáneos (Connor y Abbs, 1998; Andreatta y Barlow, 2009; ver Pilurzi et al., 2019).

A mediados del siglo pasado Kadanoff (1956) utilizó métodos de impregnación argéntica para investigar la inervación de los músculos faciales humanos y observó la presencia de una abundancia y sorprendente variedad de terminaciones nerviosas sensitivas que iban desde terminaciones nerviosas libres hasta husos neuromusculares típicos. Ello está en contradicción con los estudios posteriores en los que nunca se encontraron

husos neuromusculares en los músculos faciales humanos (Stål et al., 1987,1990; Kamen y De Luca, 1992; Happak et al., 1994; Goodmurphy y Ovalle, 1999; Cobo et al., 2017b). Recientemente May et al. (2018) han encontrado numerosos husos en la parte facial del músculo *platysma colli*.

En el territorio de los nervios glosofaríngeo y vago, lo mismo que ocurre con el territorio facial la presencia de husos neuromusculares es también muy cuestionada. Seto (1963) en su libro "*Studies on the sensory innervation (human sensibility)*" no describe husos neuromusculares en los músculos de esta región, hecho que fue confirmado posteriormente (Bossy y Vidic, 1967; Kuehn et al., 1990; Liss, 1990; Mu and Sanders, 2007) en la faringe o en el velo del paladar.

Recientemente De Carlos et al. (2013), en los músculos de la faringe, y Cobo (2016) y Cobo et al. (2017,2019), en los músculos faciales, utilizaron técnicas de inmunohistoquímica asociada a marcadores nerviosos específicos y mecanoproteínas para tratar de identificar propioceptores. Los primeros encontraron corpusculos sensitivos de tipo Ruffini-lie, Pacini y formaciones espiroideas pero nunca husos neuromusculares, Los segundos, tampoco localizaron propioceptores típicos y establecieron 3 tipos de receptores en los músculos (**Figura 2.3**): tipo I, capsulados, con una cápsula delgada, las células gliales dispuestas de forma variable y con diferentes morfologías; tipo II, parcialmente capsulados (la cápsula es continua con el perimisio), con morfología variable; tipo III, no capsulados y tanto el axón como las células Schwann-like adoptan una disposición muy variable (ver Cobo et al., 2019).

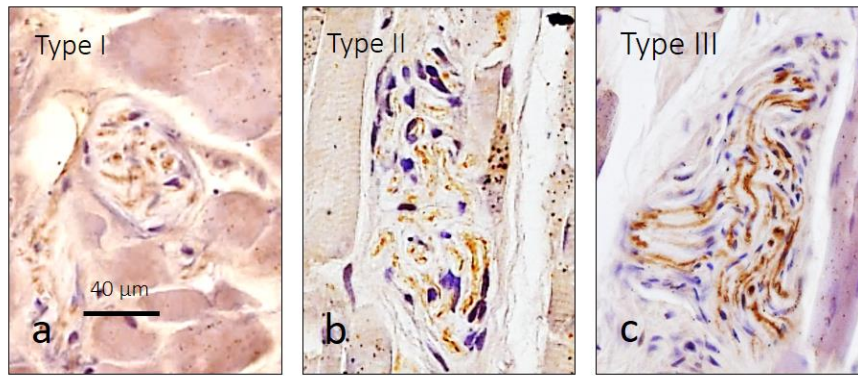


Figura 2.3.- Clasificación de los receptores sensitivos-propioceptores en los músculos faciales humanos. Tomado de Cobo et al. (2019).

2.4. Bases moleculares de la propiocepción

Según la definición de propiocepción que se hizo en las páginas anteriores, es evidente que los sensores-receptores tienen que ser deformables (acortarse y alargarse). Ello hace que el número de moléculas capaces de intervenir en la mecanotransducción se reduzca mucho ya que deben poder cambiar su estructura ante una fuerza. Según Sachs (2015) los sensores mecánicos son moléculas, u orgánulos, en las que la energía de salida es significativamente mayor que la energía de entrada. Los canales iónicos pueden hacerlo porque funcionan como enzimas que disipan mucha de la energía almacenada catalizando el transporte iónico. Por tanto, teóricamente, los canales iónicos mecanosensitivos pueden definirse como aquellos cuyo rango dinámico es accesible con fuerzas fisiológicas (Meng et al., 2011, 2012; Verma et al., 2012). Otros canales iónicos, como los voltaje-dependientes, se modulan por tensión mecánica, pero no pueden abarcar su rango dinámico solo con mecánica (Morris, 2011,2012).

Hay dos tipos básicos de canales mecanosensitivos: los que se abren-cierran por al tensión-deformación de las proteínas de la membrana celular (Moe y Blount, 2005; Martinac et al., 2014) y los que abren-cierran por la tensión de las proteínas

estructurales unidas a ellos (es decir, de la matriz extracelular y del citoesqueleto; Meng et al., 2011; Suchyna et al., 2007,2009,2011; Huang et al., 2013; Martinac, 2014) (**Figura 2.4**).

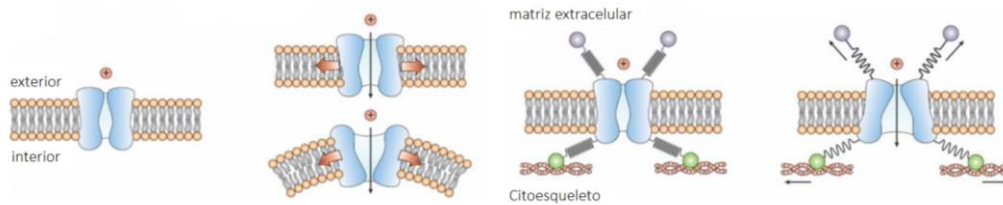


Figura 2.4.- Tipos básicos de canales mecanosensitivos. Modificado de Ridone et al. (2019).

La transducción de la tensión mecánica de músculos y articulaciones en señales eléctricas están mediados por canales iónicos Na^+ y, en menor medida, Ca^{2+} (Hunt et al., 1978). Hasta ahora se han identificado proteínas ENa^+C (epitelial sodium channels) en las vesículas sinapstofisina-positivas de los husos neuromusculares de rata aunque no existen pruebas concluyentes de su participación en la propiocepción (Simon et al., 2010). También se ha postulado la participación en ella de los canales iónicos de la familia ASIC (acid-sensing ion channels) que se expresan en los aferentes musculares y detectan acidosis extracelular y otros metabolitos liberados durante la isquemia y el ejercicio (Simon et al., 2010). El estudio llevado a cabo por Gautam y Benson (2013) demostraron que los heterodímeros de canales ASIC1a, ASIC2a y ASIC3 son los principales canales en las aferencias musculares del músculo esquelético, pero no se puede confirmar categóricamente su participación en la propiocepción.

2.5. Piezo2 y propiocepción

2.5.1. Piezo2

Aunque como se expuso en el apartado anterior son varios los candidatos a posibles mediadores de la mecanotransducción-propiocepcion, Piezo2 es el que ha demostrado que cumple todos los requisitos para ser considerado el responsable casi único del proceso, siendo actualmente considerado el transductor para la sensación táctil y la propiocepción.

Piezo 1 y Piezo2 forman una familia de canales iónicos identificados hace una década por Coste et al. (2010) a partir de células N2A de neuroblastoma N2A. Esta familia está bien conservada evolutivamente y son los canales iónicos de mayor tamaño identificados hasta la fecha. Sus homólogos y ortólogos se encuentran en plantas, eucariotas unicelulares e invertebrados. Los canales Piezo del ratón son catiónicos no selectivos, formados por 2521 y 2752 aminoácidos para Piezo1 humano y Piezo2 humano, respectivamente, y tienen una identidad del 42 % (Honoré et al., 2015). Recientemente se ha aclarado la estructura y las propiedades de sensibilidad mecánica de Piezo1 (Zhao et al., 2018) y Piezo2 (Taberner et al., 2019; Wang et al., 2019). Piezo1 está formado por tres subunidades con 16-18 hélices transmembranas (Coste et al., 2015; Ge et al., 2015; Zhao et al., 2016). En el caso de Piezo 2 se trata de una proteína de transmembrana que se requiere en los canales catiónicos no selectivos mecanosensibles en células de mamíferos, aunque los canales iónicos mecanosensibles pueden abrirse también independientemente de estrés mecánico (Honore et al., 2015; Taberner et al., 2019; Wang et al., 2019). Funcionalmente, Piezo1 es un sensor más polimodal para las fuerzas mecánicas que detectan un mayor número de estímulos, mientras que Piezo2 está más adaptado para detectar específicamente el tacto mecánico (Bagriantsev y Gracheva, 2014; Wu et al., 2017).

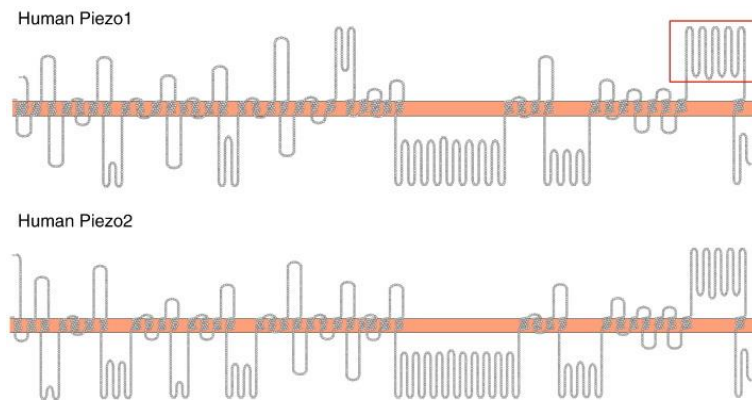


Figura 2.5.- Estructura de los canales mecanosensitivos Piezo1 y Piezo2 humanos. Modificado de Soatin et al. (2016).

2.5.2. Distribución de Piezo2 en mecanorreceptores

Las proteínas Piezo se expresan en una amplia gama de tejidos normales y neoplásicos que funcionan desconocidas (Bagriantsev y Gracheva, 2014). En estos tejidos se sospecha que, al menos Piezo1, participan en procesos biológicos asociados a la mecánica, como la detección de la tensión por cizallamiento en los vasos sanguíneos, la regulación del flujo de orina y la distensión vesical, el desarrollo celular, el volumen migración celular, proliferación y elongación (Bagriantsev y Gracheva., 2014; Honore et al., 2015; Anderson et al., 2017; Wu et al., 2017).

Piezo2, objetivo principal de esta tesis, se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso periférico de los vertebrados. Utilizando diferentes métodos se ha detectado en una subpoblación de neuronas en los ganglios raquídeos, células de Merkel, complejos célula de Merkel-axon, y corpúsculos de Meissner además de las terminaciones nerviosas lanceoladas de la piel con pelo (Coste et al., 2010; Ikeda et al., 2014; Li et al., 2014; Maksimovic et al., 2014; Ranade et al., 2014; Woo et al.,

2014,2015; García-Mesa et al., 2017; García-Piqueras et al., 2019). Recientemente Florez-Paz et al. (2016) han estudiado la expresión de Piezo2 en las neuronas propioceptivas del núcleo mesencéfalo del trigémino que participan en el procesamiento de información propioceptiva de la cara y la cavidad oral. Las alteraciones en la coordinación de esas zonas tras la eliminación selectiva de Piezo2 demuestran que este canal cumple un papel crítico en las neuronas propioceptoras que inervan los músculos de la cabeza.

Pero además, Piezo2 se encuentra ampliamente distribuido en células no nerviosas como condrocitos (Lee et al., 2014), odontoblastos (Khatibi Shahidi et al., 2015), células endoteliales (Ferrari et al., 2015), astrocitos (Choi et al., 2015) y células enterocromafines del intestino (Wang et al., 2017).

De acuerdo con las funciones que se le atribuyen, los animales deficientes en Piezo2 tienen ausencia de contacto ligero y de la propiocepción sin que se afecten otras funciones somatosensoriales (Ranade et al., 2014; Woo et al., 2015). Las mutaciones en el gen que codifica para Piezo2 en humanos se manifiestan clínicamente por una pérdida selectiva de la percepción del tacto y disminución de la propiocepción así como síndromes complejos que implican articulaciones, músculos oculares y desarrollo óseo (McMillin et al., 2014; Alisch et al., 2016; Chesler et al., 2016; Mahmud et al., 2016; Alper et al., 2017; Haliloglu et al., 2017).

2.5.3. Piezo2 en husos neuromusculares

Un subconjunto de neuronas mecanosensibles de los ganglios raquídeos DRG son propioceptoras que se caracterizan por la expresión de la proteína ligante del calcio parvalbumina (Pvalb) (Arber et al., 2000). Los propioceptores son mecanorreceptores de bajo umbral y adaptación lenta que inervan los husos neuromusculares y los órganos tendinosos de Golgi (Proske y Gandevia, 2012; Proske, 1015). El estudio de Woo et al. (2015) demostró que Piezo2 es el principal mecanotransductor en los husos neuromusculares del ratón. Estos autores utilizaron dos cepas condicionales de ratón knockout para Piezo2 que carecían de propioceptores parvalbumina-positivos. Los animales mostraron un profundo deterioro de la coordinación en las extremidades y alteraciones en el funcionamiento de los husos neuromusculares. Recientemente, un elegante estudio del grupo Ana Gomis corroboró estos hallazgos utilizando neuronas propioceptoras del núcleo mesencefálico (Florez-Paz et al., 2016).

3. Hipótesis y Objetivos

3. Hipótesis y Objetivos

Los músculos cefálicos realizan movimientos finos que requieren ajustes permanentes del tono muscular y, por tanto, tienen que poseer mecanorreceptores-proprioceptores al inicio de los arcos nerviosos responsables de los mismos.

El **objetivo general** del estudio es contribuir al conocimiento de las bases de la propiocepción cefálica.

Los **objetivos específicos** son los siguientes:

- 1.- Estudiar y clasificar los tipos de propioceptores en los músculos cefálicos humanos correspondientes al territorio de los nervios trigémino, facial, glossofaríngeo, vago e hipogloso.
- 2.- Establecer la densidad relativa de propioceptores en los músculos cefálicos humanos analizados.
- 3.- Determinar los patrones de expresión de la mecanoproteína Piezo2 en los propioceptores cefálicos y la posible co-localización con la mecanoproteína ASIC2.
- 4.- Analizar la presencia de mecanorreceptores atípicos en los músculos inervados por el nervio trigémino en ratones deficientes en el sistema NT-3/TrkC.

4. Material y técnicas

4. Material y técnicas

4.1. Material

Para la realización del trabajo se utilizó material humano y de ratón. El material humano procedía de cadáveres y piezas cadavéricas criopreservadas, no fijadas, y de piezas de necropsias obtenidas en el Área de Anatomía y Embriología Humana de la Universidad de Oviedo, de la Sección de Anatomía del Departamento de Anatomía y Radiología de la Universidad de Valladolid, y de los Servicios de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo) y Complejo Hospitalario Universitario de Salamanca.

El material de ratón se obtuvo del laboratorio del Grupo SINPOS (Sistema Nervioso Periférico y Órganos de los Sentidos) del Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Oviedo. Todos los experimentos y técnicas se desarrollaron en las dependencias y laboratorios del Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Oviedo (Laboratorio 9.11) y Sección de Patología Animal del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias.

4.1.1. Material humano: obtención y procesado de las piezas

Las piezas cadavéricas y de autopsia se correspondían a 7 varones y 5 mujeres, de edades comprendidas entre los 61 y 83 años. De todos ellos se obtuvieron piezas de espesor completo en los que estaban incluidos músculos de la cara, del velo del paladar y de la faringe.

Además, se emplearon piezas de diferentes partes de la cara que incluyen el espesor completo de las mismas (desde piel a periostio o mucosas), procedentes de 5 hemicaras de cadáveres congelados, obtenidos del Área de Anatomía y Embriología Humana del Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad Oviedo (n = 4) y del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca (n = 1). Correspondían a 3 varones y dos mujeres, de edades comprendidas entre los 46 y 81 años.

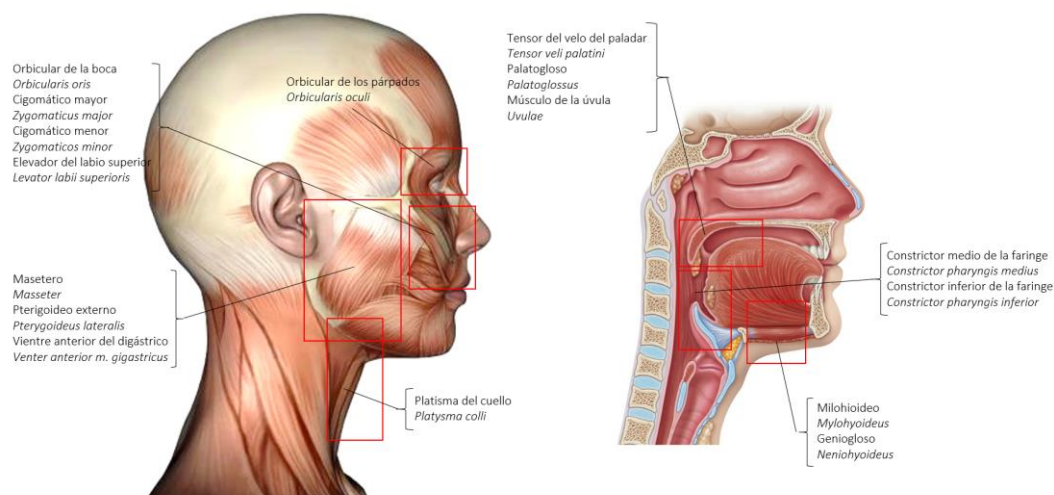


Figura 4.1.- Regiones de la cabeza de la que se obtuvieron las piezas de estudio y músculos estudiados en cada una de ellas. Cada una fue orientada antes de la inclusión en parafina para la identificación correcta de los músculos.

Las zonas de obtención del material y que sirven de referencia a la hora de exponer los resultados, se recogen en la **figura 4.1**. El material cropyreservado y fres fue lavado en una olución salina fria durante 1 hora, dividido en segmentos y

fijado durante 48 h en formol al 10% tamponado (PBS 0.1M, pH 7,4), posteriormente procesado de forma rutinaria para su inclusión en parafina.

Como controles positivos en todos los procesos se incluyeron muestras de piel de los pulpejos de los dedos (Registro Nacional de Biobancos, Sección colecciones, Ref. C-0001627) y el estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Biomédica del Principado de Asturias, España (Cod. CEIm, PAst: Proyecto 266/18). Todo el material se obtuvo de acuerdo con la legislación española (RD 1301/2006; Ley 14/2007; DR. 1716/2011; Orden ECC 1414/2013) y las directrices de la Declaración II de Helsinki.

El proceso de inclusión en parafina fue como sigue: las piezas se deshidrataron en una batería de etanoles de gradación creciente (70%: 24horas; 80%: 1 hora; 90%: 1 hora; 96%: 1 hora; 100%: 1 hora x 3), se diafanizaron en isopropanol (100%: 30 min x 3) y se pasaron por parafinas blanda (30 min a 55° C) y dura (2 horas a 60° C). Las muestras se cortaron de forma seriada a un grosor de 5 µm y 10 µm con un microtomo convencional (Microm) y se utilizaron para las técnicas del hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson, y de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Las secciones obtenidas fueron recogidas sobre portaobjetos gelatinizados y secadas en estufa a 45° C durante 24h como mínimo antes de ser utilizadas. Antes de la realización las diferentes técnicas, se procedió a la desparafinización mediante baños en xilol 100% (20 min x2) y la rehidratación se realizó pasando los cortes por una batería de alcoholes de gradación decreciente (de 10 min cada uno) hasta agua corriente (20 min). A continuación, se seleccionaron algunas secciones para la realización de una tinción rutinaria de hematoxilina y eosina, con el fin de comprobar la integridad estructural de los tejidos e

identificar las estructuras objeto de estudio para la realización de las técnicas de inmunohistoquímica simple o de doble inmunofluorescencia.

4.1.2. Material de ratón: obtención y procesado de las piezas

El estudio se realizó sobre cabezas de ratones recién nacidos (0d), de 7 y de 15 días proporcionados por la Prof. Isabel Fariñas (Universidad de Valencia) que fueron generados sobre el fondo genético de la cepa C57B1/6. En el estudio se incluyeron ratones NT-3 +/+ (n = 2) y TrkC +/+ (n = 5), NT-3 +/- (n = 2) y TrkC +/- (n = 3), y animales TrkC-/- (n = 2) y NT-3-/- (n = 3); los animales con mutaciones eran portadores de mutaciones no funcionales. El genotipado de los animales se realizó mediante PCR en el laboratorio de origen. Los animales fueron perfundidos por vía transcardiaca con una solución fría de paraformadehído al 4%. A continuación, se separaron las cabezas y se mantuvieron en la misma solución durante 48 h, se procedió a su descalcificación (una solución de formol al 10%, ácido nítrico 15,4 M y agua destilada, 10:5:85 v/v, hasta la descalcificación completa). Finalmente, las piezas se lavaron en agua corriente durante 24 h y se procesaron para su inclusión en parafina.

4.2. Técnicas

4.2.1. Técnicas estructurales: Hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson

La técnica de la hematoxilina-eosina se realizó de manera rutinaria en un procesador automático. Para la realización de la técnica del tricrómico de Masson las secciones hidratadas se pasan por hematoxilina de Weigert (5 min),

después se lavan con agua corriente (10 min), seguido de tinción en fucsina de Ponceau (5 min), ácido fosfomolibdico (5 min) y verde luz (5-7 min). Mediante esta técnica el tejido conectivo aparece de color verde, el tejido epitelial del color rojo y el muscular pardo.

4.2.2. Técnica de inmunohistoquímica: Inmunoperoxidasa indirecta mediante la técnica de la PAP

Se llevó a cabo sobre secciones de tejido humano y de ratón. Para la realización de la técnica de inmunohistoquímica las secciones desparafinizadas y rehidratadas, se lavaron en una solución de TBS (tris buffer solution) a pH 7.4. A continuación, se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena durante 10 minutos con una solución en tampón de H₂O₂ al 3%; después las secciones se lavaron en el mismo tampón durante 10 minutos. Tras bloquear las uniones inespecíficas con albúmina sérica bovina al 10% durante 20 minutos, las secciones, sin lavar, se incubaron durante la noche a 4° C, en cámara húmeda, con los anticuerpos primarios que se incluyen en la Tabla 4.1. Tras la incubación con el anticuerpo primario, las secciones se lavaron en TBS (15 min) y después se incubaron durante 30 minutos, a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario (Dako EnVision labelled polymer-HR anti-conejo IgG o anti-ratón IgG).

Tabla 3.1.- Anticuerpos primarios utilizados en el estudio

Anticuerpo	Origen y especificidad	Dilución	Proveedor
anti-NFP	Ratón	1:1000	Santa Cruz Biotechnology ¹
Anti-S100P	Conejo	1:100	Dako ²
Anti-ASIC2	Conejo	1:200	Lifespan Biosciences ³
Anti-Piezo2	Conejo (1)	1:100	Sigma-Aldrich, Spain ⁴

¹Santa Cruz, CA, USA; ²Glostrup, Denmark; ³Seattle, WA, USA; ⁴Madrid, España.
(1) secuencia: FEDENKAAVRIMAGDNVEICMNLDAASFSQHNP

Finalmente, tras un lavado en TBS se reveló la inmunorreacción con una solución de 3-3' diaminobencidina (DAB, kit de revelado de Dako).

Las secciones se contrastaron con hematoxilina, se lavaron en agua, se deshidrataron en una batería de alcohol etílico en concentración creciente, se diafanizaron en xilol y se montaron con Entellan®. 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. En estas condiciones no se observó inmunomarcaje específico.

4.2.3. Técnica de triple inmunofluorescencia

Con el objeto de establecer con exactitud la localización de Piezo2 mecanorreceptoras en las estructuras sensitivas de los músculos cefálicos se realizó doble inmunofluorescencia (más una tercera de contraste mediante DAPI). Las secciones se desparafinaron, hidrataron y lavaron en una solución de TBS (tris buffer solution) a pH 7.4 y las uniones inespecíficas se redujeron mediante incubación durante 30 min en una solución del 5% de albúmina de suero bovino en tampón (TBS, pH 7,4). A continuación se incubaron las secciones durante toda la noche, a 4° C en una cámara húmeda, con una mezcla 1:1 de los siguientes anticuerpos: anti-ASIC2, y anti-Piezo2 y anti-S100 (Dako, monoclonal, diluido 1:500, que marca las células gliales periféricas); anti-Piezo2 y anti-neurofilamento (Dako, monoclonal, diluido 1:1000); anti-ASIC2 y anti-Piezo2 y anti-neurofilamento (Dako, monoclonal, diluido 1:1000). Después de un lavado en TBS (15 min en oscuridad), las secciones se incubaron durante 1:30 h con suero de

cabra anti-IgG de conejo conjugado CyTM3 (Jackson-ImmunoResearch, Baltimore, MD, EE.UU.) diluido a 1:100 en TBS. A continuación, se volvieron a lavar en el mismo tampón (15 min en oscuridad) y se incubaron durante otra hora con un anticuerpo de asno anti-ratón conjugado y con el fluorocromo Alexafluor-488 (Serotec, Oxford, Reino Unido), diluido al 1:1000 en TBS. Ambos pasos se realizaron a temperatura ambiente en una cámara húmeda oscura. A continuación se lavaron las secciones (15 min en oscuridad) y finalmente, para verificar detalles estructurales, las secciones se contratiñeron con DAPI Fluoromount -G (Southern Biotech, cat N°0100-20). La doble fluorescencia desarrollada se detectó utilizando un microscopio Leica DMR-XA de fluorescencia automática con Software Leica Confocal, versión 2.5 (Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Alemania). Las imágenes capturadas fueron procesadas con el software "Image J versión 1.43g Master Biophotonics Facility", Mac Master University Ontario (www.macbiophotonics.ca) (Unidad de Análisis de Imágenes, Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo). Para determinar la especificidad de la inmunofluorescencia, se procesaron secciones representativas de la misma manera utilizando sueros de conejo o ratón no inmunes en lugar de los anticuerpos primarios u omitiendo los anticuerpos primarios en la incubación.

4.2.4. Microscopía electrónica

Muestras de los músculos masetero de las diferentes cepas de ratones se procesaron para su inclusión en resina Durcapan© (Fluka) siguiendo el siguiente procedimiento: lavado repetido en PBS 0.1 M (pH 7.4) durante dos días, y posterior deshidratación en acetona de gradaciones crecientes (50%, 70%, 90% y acetona anhidra). A continuación, las piezas se pasaron por mezclas de acetona anhidra y resina de concentraciones

crecientes (3:1, 1:1, 1:3) y finalmente en resina pura. Cada paso tuvo una duración de una hora y se realizó en estufa a 60° C. Tras la confección de los bloques se realizaron cortes semifinos que se tiñeron con azul metileno. Sobre los campos seleccionados se procedió a la realización de cortes ultrafinos que se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Finalmente, las rejillas se observaron y fotografiaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL-JEM-T8, en los Servicios comunes de investigación de la Universidad de Oviedo.

4.2.5. Análisis cuantitativo

En las secciones completas de las diferentes regiones faciales teñidas con tricrómico de Masson (5 campos en 10 secciones separadas entre ellas 1 mm) se realizó un estudio morfométrico utilizando un analizador de imágenes automático de la imagen Quantimet 550, Leika, Programa QWIN (Servicios de Investigación, Universidad de Oviedo). El microscopio fotónico empleado fue un Olympus BX-61 con luz transmitida, con un objetivo 4x, de apertura numérica 0,6, y un objetivo UPlanSApo. En cada una de las secciones se determinó el número de estructuras nerviosas presumiblemente mecanorreceptoras que cumplen los criterios de los tipos establecidos por Cobo et al. (2019); este estudio se realizó sobre secciones procesadas para la determinación de la proteína S100.

Por otro lado, sobre 5 preparaciones completas procesadas para la doble inmunodetección de Piezo2+ASIC2 se estableció el porcentaje de estructuras mecanorreceptoras Piezo2 positivas y Piezo2+ASIC2 positivas, considerando como valor absoluto (100%) el de las formaciones reactivas para la proteína S100.

5. Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Presencia de propioceptores típicos en los músculos cefálicos

Los propioceptores típicos de los músculos cefálicos humanos están representados por los husos neuromusculares ya que al carecer la mayoría de ellos de verdaderos tendones no se han descrito en ellos órganos tendinosos de Golgi.

De todos los músculos estudiados, sólo se han encontrado con regularidad husos neuromusculares típicos en los músculos masetero, pterigoideo externo y platisma del cuello (**Figura 5.1**); excepcionalmente se han encontrado en los músculos digástrico, geniogloso y milohioideo (**Figura 5.2**).

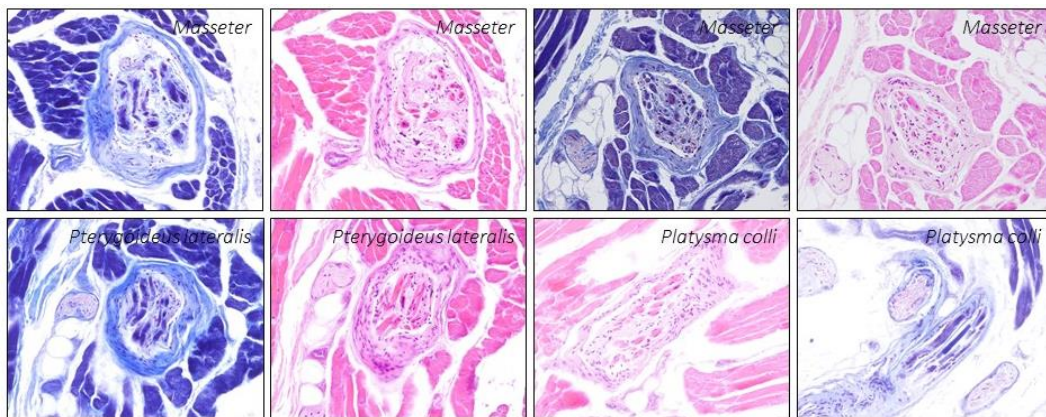


Figura 5.1.- Secciones seriadas de husos neuromusculares teñidos con las técnicas de hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson en los músculos masetero, perigoideo externo y platisma del cuello humanos.

En los músculos donde la densidad de husos neuromusculares era alta, estaban formador por una cápsula multilaminar muy bien desarrollada, un espacio intralaminar poco amplio y un número variable de fibras musculares intrafusales (que oscilaba entre 4 y 12). Con las técnicas utilizadas y dada la dimensión de estas formaciones, no fue posible identificar ni establecer la proporción de fibras intrafusales en cadena y en saco

nuclear. En los músculos en los que la densidad de husos neuromusculares fue baja, con carácter general, el tamaño de los músculos fue menor, tenían menos fibras intrafusales y la capsula estaba mucho menos desarrollada.

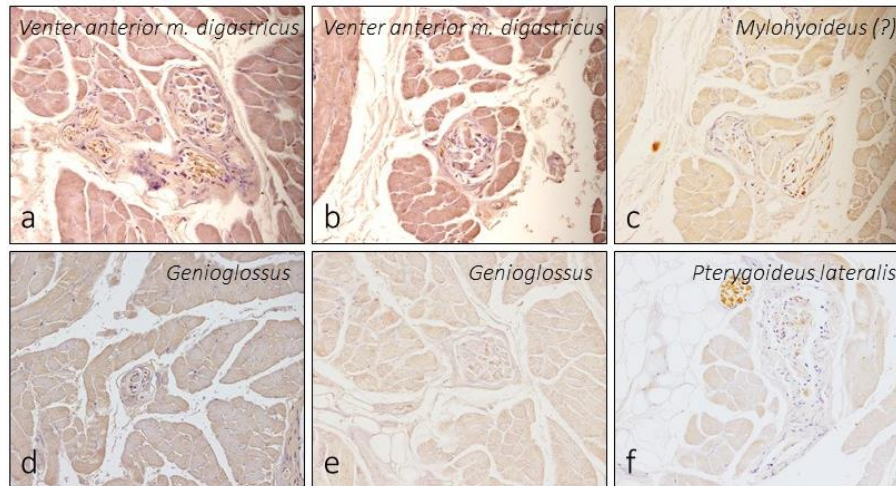


Figura 5.2.- Secciones de husos neuromusculares teñidos para la demostración de la proteína del neurofilamento en los músculos vientre anterior del digástrico (a,b), milohioideo (c), geniogloso (d,e) y pterigoideo lateral (f) humanos.

5.2. Identificación morfológica de propioceptores atípicos en los músculos cefálicos

La identificación de los receptores sensitivos/propioceptores atípicos en los músculos cefálicos se basó en los siguientes criterios (ver Cobo et al., 2019): no encontrarse en el trayecto de los nervios, estar en relación estrecha, yuxtapuestos, con las fibras musculares, y presentar un aspecto morfológicamente diferenciado. Además, como identificación definitiva se ha utilizado el criterio de expresión de inmunorreacción con un patrón nervioso de la mecanoproteína Piezo2, además de la posible expresión de ASIC2, bien en el terminal axónico, células gliales periaxónicas y cápsula. Por otro lado, teniendo en cuenta la gran variabilidad en la densidad y morfología de los propioceptores atípicos, en los músculos cefálicos estudiados, se ha utilizado como criterio de inclusión en el trabajo (tanto en la descripción morfológica como en la

determinación de la densidad) que puedan ser incluidos en algunos de los tres tipos de la clasificación de Cobo et al. (2019).

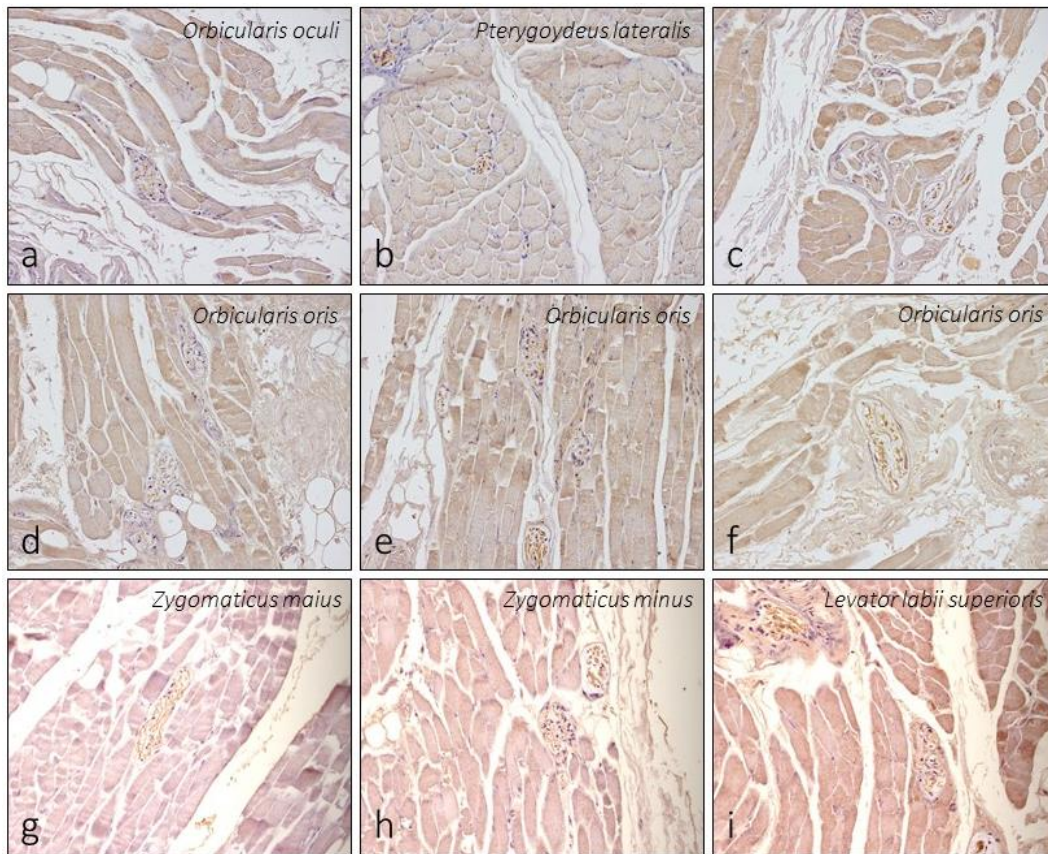


Figura 5.3.- Propioceptores atípicos, correspondientes a los morfotipos I, II y III (clasificación de Cobo et al., 2019) en diferentes músculos del territorio del nervio facial.

En todos los músculos del territorio del nervio trigémino y facial estudiados, así como en el músculo geniogloso, se han encontrado propioceptores atípicos en distintas proporciones (**Figura 5.3** y **Tabla 5.1**). En los propioceptores de tipo I los axones neurofilamento positivos se disponen formando ovillos, perfiles axónicos de distintos calibres localizados dentro de una cápsula más o menos organizada o terminan en dilataciones. Los propioceptores del grupo II son parcialmente capsulados, de morfologías muy variables en las que predomina aparentemente los axones sobre las

células de Schwann-like, y la capsula está en estrecho contacto con el perimio. Los propioceptores de tipo III pueden confundirse con haces de fibras nerviosas y su morfología es también muy irregular.

Por lo que respecta a los músculos de los territorios de los nervios glosofaríngeo y vago, en ellos nunca se han observado husos neuromusculares, y si diferentes morfotipos de formaciones nerviosas sensitivas, más o menos complejas y dotadas ocasionalmente de una cápsula bien diferenciada, que pueden identificarse como formaciones nerviosas sensitivas (**Figuras 5.4, 5.5 y 5.6**). Aunque por su morfología no pueden asimilarse a ningún tipo de formación nerviosa sensitiva, su perfil inmunohistoquímico permite identificarlas como propioceptores. Un tipo de formación sensitiva característica de los músculos constrictores de la faringe son los que tienen disposición espiroidea (**Figura 5.4.c**).

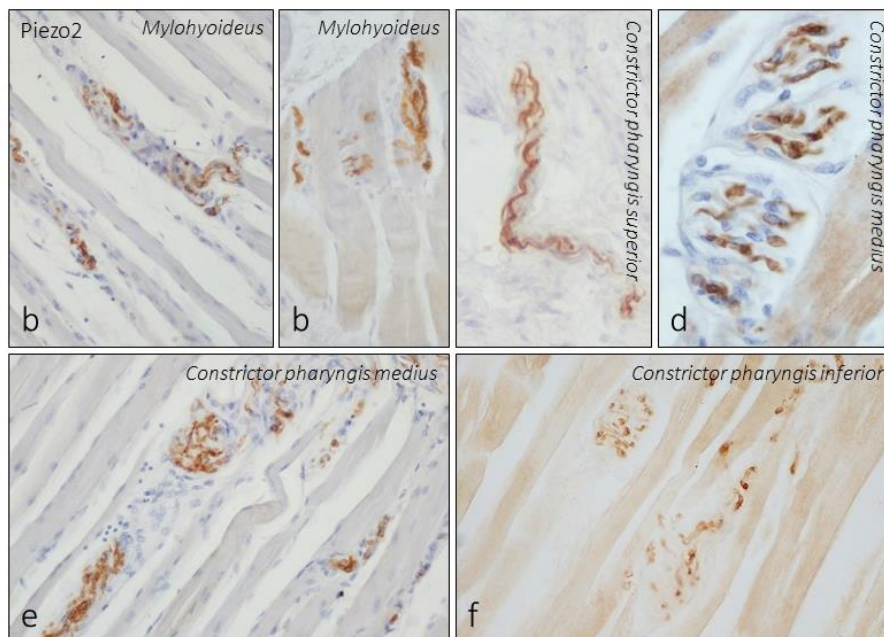


Figura 5.4.- Estructuras nerviosas sensitivas inmunorreactivas para Piezo2 presentes en diferentes músculos pertenecientes al territorio del nervio trigémino (milohioideo, a-b) y de los nervios glosofaríngeo y vago (constrictores de la faringe; c-f).

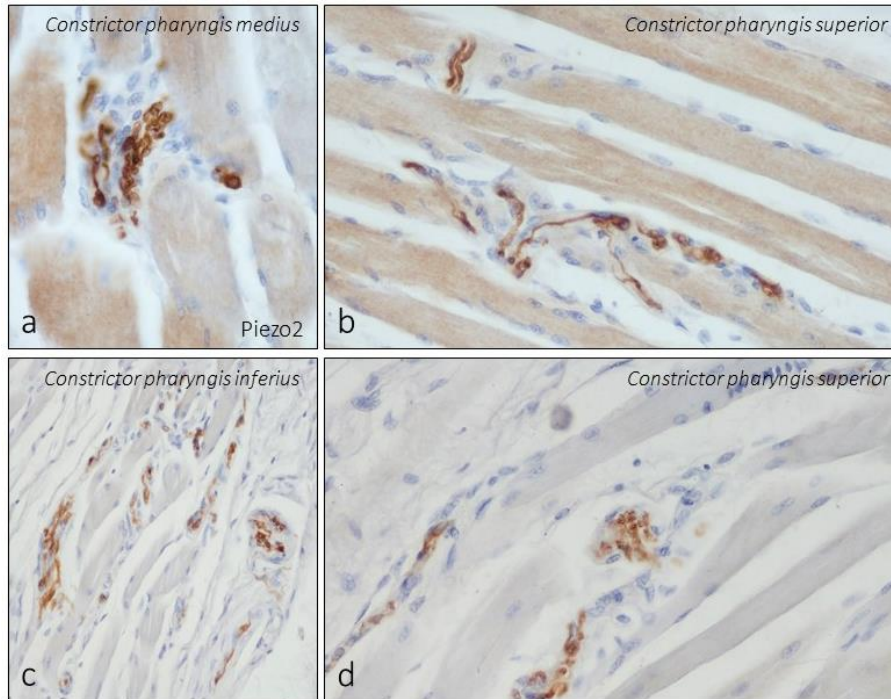


Figura 5.5.- Estructuras nerviosas sensitivas inmunorreactivas para Piezo2 presentes en diferentes músculos pertenecientes al territorio de los nervios glossofaríngeo y vago (constrictores de la faringe).

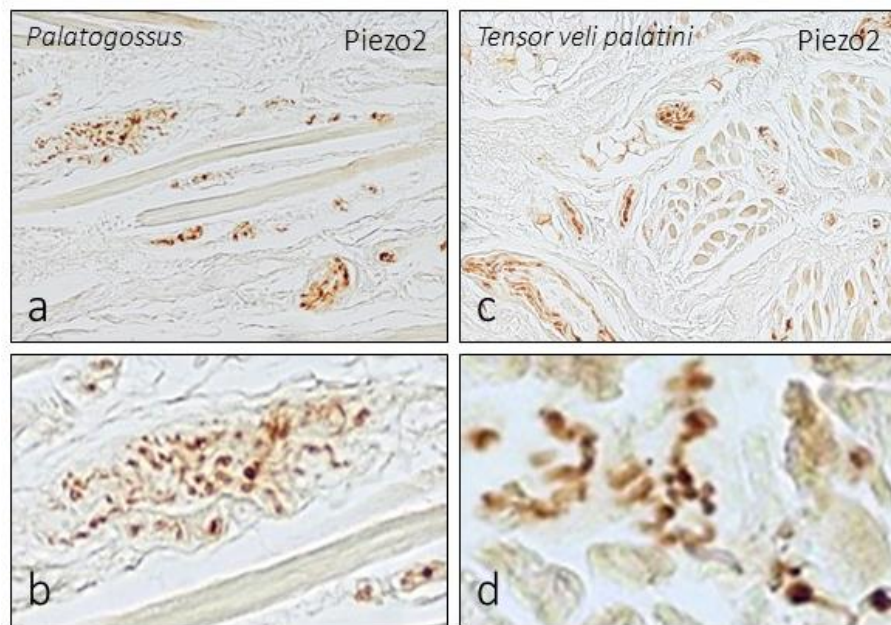


Figura 5.6.- Estructuras nerviosas sensitivas inmunorreactivas para Piezo2 presentes en diferentes músculos pertenecientes al territorio del nervio trigémino (tensor del velo del paladar) y de los nervios glossofaríngeo y vago (palatogloso).

Las densidades de husos neuromusculares, de propioceptores atípicos faciales y de formaciones nerviosas sensitivas en los músculos del velo del paladar y la faringe se recogen en la **Tabla 5.1**.

Tabla 5.1.- Densidad media de formaciones nerviosas presentes en los músculos faciales. Los contajes se realizaron en 5 secciones por cada uno de los músculos con una separación entre los cortes de 200 µm. *Existen dudas acerca de la identificación del músculo. **Tercio superior; ***Tercio inferior.

Músculo	HNM	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Fibras
Territorio del nervio trigémino					
M. Masseter	23	3	3	6	Si
M. Pterygoideus lateralis	18	3	14	7	Si
Venter anterior m. dygastricus	2	3	1	1	Si
M. Mylohyoideus	1*	4	2	2	Si
M. Tensor veli palatini	0	2	2	1	Si
Territorio del nervio facial					
M. orbicularis oris	0	7	22	16	Si
M. orbicularis oculi	0	6	12	8	Si
M. zygomaticus maior	0	2	3	3	Si
M. zygomaticus minor	0	1	1	1	Si
M. levator labii superioris	0	1	1	3	Si
M. platysma colli	12** 8***	11 7	4 7	6 8	Si Si
Territorio del nervio hipogloso					
M. genioglossus	1*	16	28	10	Si
Territorio de los nervios glossofaríngeo y vago					
	Caps.	No Caps.	Fibras		
M. Palatoglossus	0	4	4	Si	
M. uvulae	0	2	3	Si	
M. constrictor pharyngis superior	0	6	14	Si	
M. constrictor pharyngis medius	0	5	9	Si	

5.3. Expresión y co-expresión de mecanoproteínas en los propioceptores de los músculos cefálicos

La presencia de canales iónicos mecanosensibles es la condición *sine qua non* para que se produzcan los procesos de la mecanotransducción, incluida la propiocepción en los terminales nerviosos. En una primera parte del estudio se validó el anticuerpo anti-Piezo2 incubando cortes de piel y de músculo gástrico. En la piel, y de acuerdo con

resultados previos de nuestro laboratorio (García-Mesa et al., 2017) se detectó inmunorreacción para Piezo 2 en los axones de los corpúsculos de Meissner y en los citoplasmas de las células de Merkel (**Figura 5.7**).

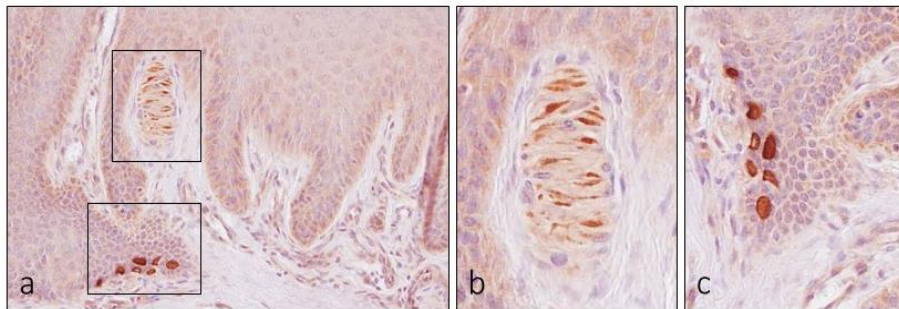


Figura 5.7.- Detección inmunohistoquímica de Piezo2 en los corpúsculos de Meissner (b) y en las células de Merkel (c) de la piel glabra digital humana.

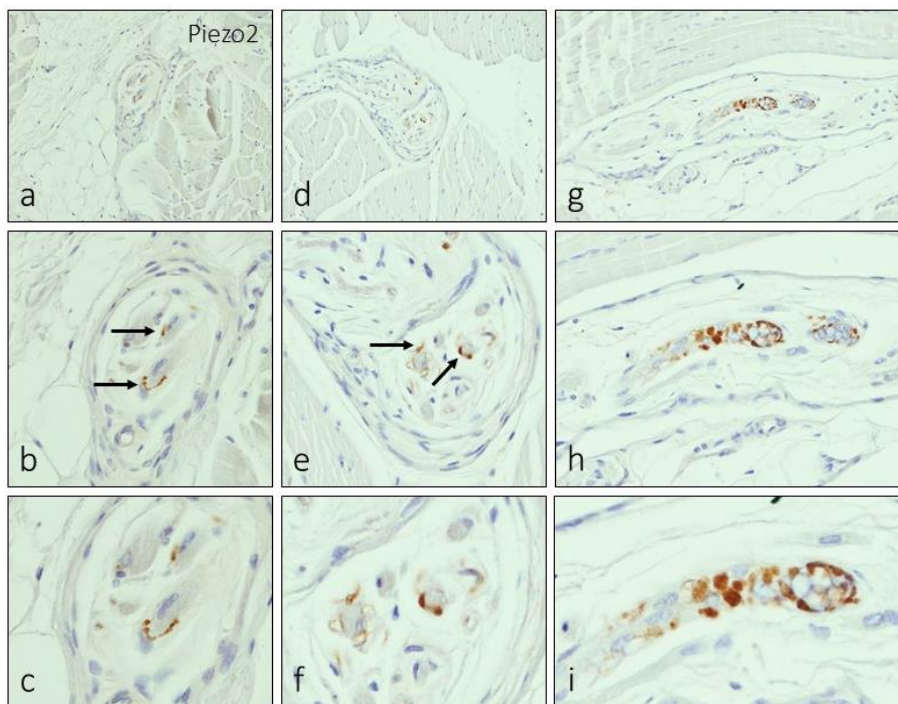


Figura 5.8.- Detección inmunohistoquímica de Piezo2 en secciones transversales (a-f) y longitudinales (g-i) de husos neromusculares de músculo gastronemio humano.

Por lo que respecta a los husos neuromusculares, tanto en las secciones transversales (**Figura 5.8 a-f**) como en las longitudinales (**Figura 5.8 g-i**) Piezo2 se detectó en perfiles nerviosos situados principalmente alrededor de la región ecuatorial de las fibras musculares intrafusales, aunque nunca llegan a circundarlas completamente.

Por tanto, el anticuerpo anti-Piezo2 utilizado marca de manera selectiva y eficaz las terminaciones nerviosas de las estructuras donde tiene lugar la mecanotransducción.

En la mayoría de los husos neuromusculares identificados se ha identificado tanto la presencia de Piezo2 como de ASIC2. En todos los casos la inmunorreacción apareció en perfiles axónicos aparentemente coincidentes con los axones que inervan las fibras intrafusales (**Figura 5.8**). Además los estudios de doble inmunofluorescencia indican claramente que Piezo2 se localiza en el axón (**Figura 5.9**), ya que se colocaliza con el neurofilamento, mientras que ASIC2 se detectó tanto en las células de Schwann-like como en los axones (**Figura 5.10**) y en la mayoría de las fibras nerviosas intrafusales co-localizan Piezo2 y ASIC2 (**Figura 5.11**).

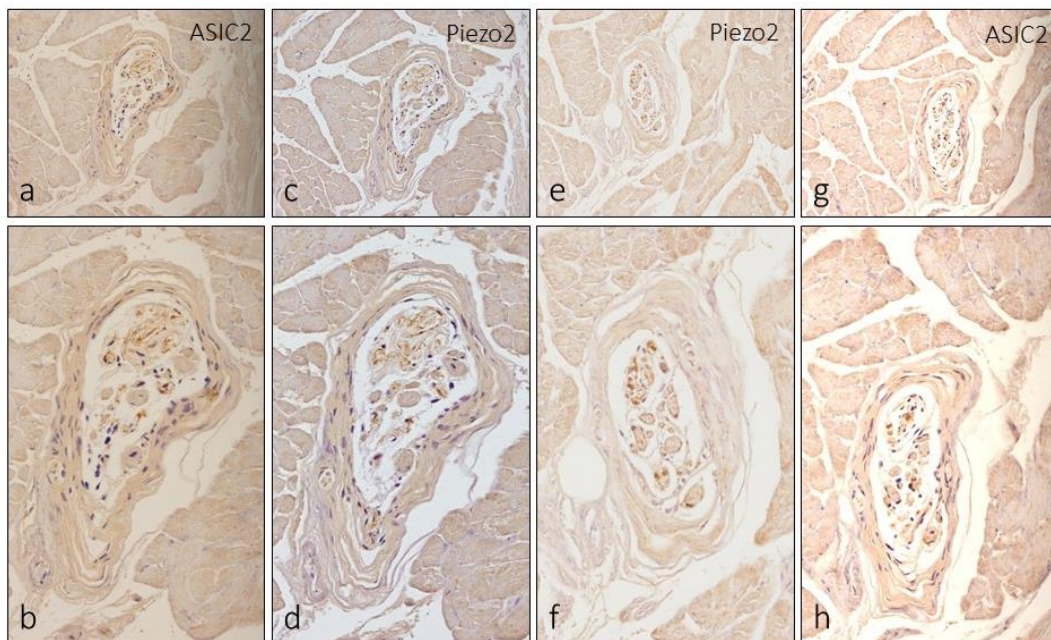


Figura 5.9.- Detección inmunohistoquímica de Piezo2 y ASIC2 en los husos neuromusculares presentes en los músculos de masetero (a-d) y pterigoideo externo (e-h) humanos.

Aparte de los en los husos neuromusculares, en los propioceptores atípicos faciales y en las formaciones nerviosas sensitivas-propioceptivas identificadas en el resto de los

músculos analizados se ha detectado la presencia en ellos de las dos mecanoproteínas investigadas en conjunto o segregadas (Figuras 5.12 a 5.17).

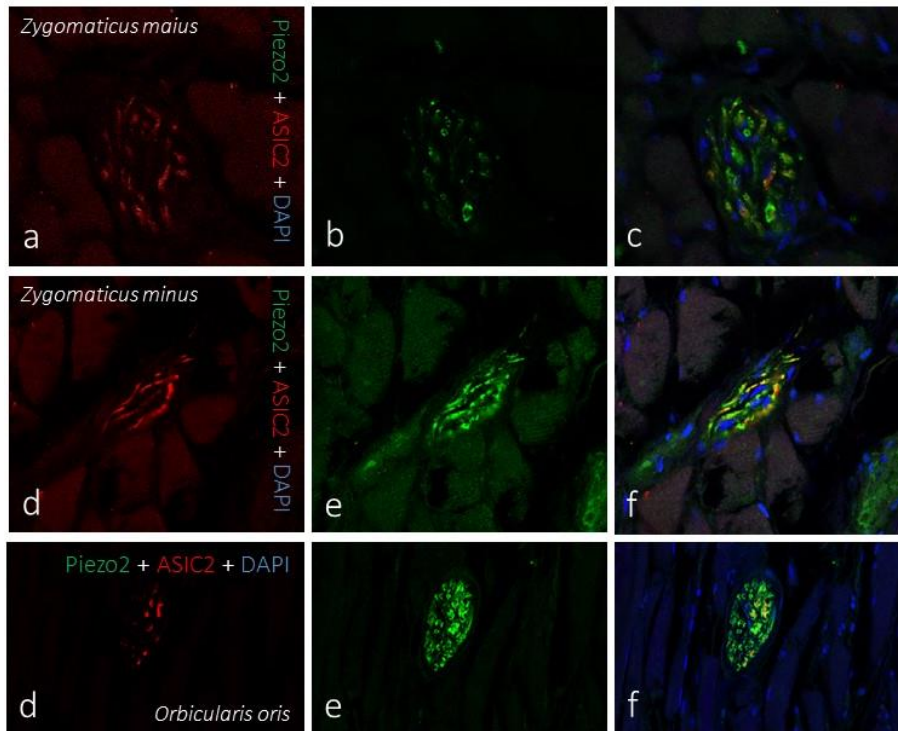


Figura 5.12.- Detección inmunohistoquímica de Piezo2 y ASIC2, con co-localización parcial de las mismas en algunos de los músculos faciales estudiados.

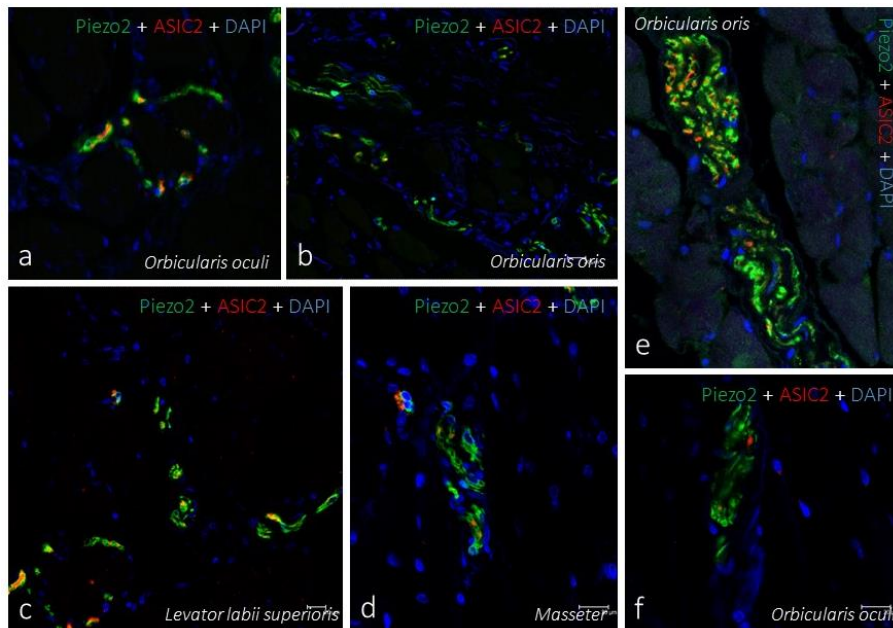


Figura 5.13.- Detección inmunohistoquímica de Piezo2 y ASIC2, con co-localización parcial de las mismas en algunos de los músculos faciales estudiados.

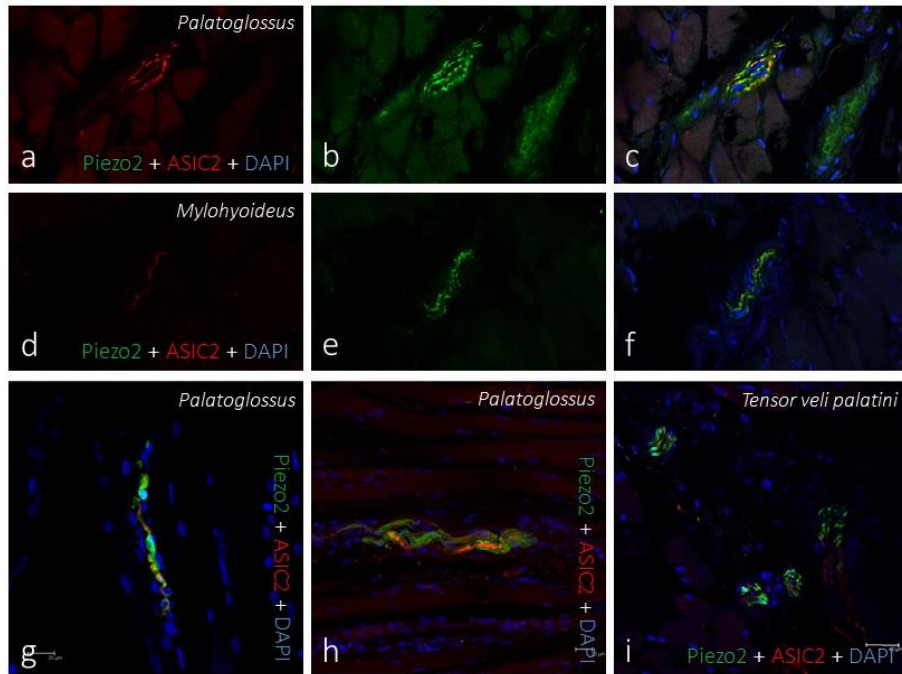


Figura 5.14.- Detección inmunohistoquímica de Piezo2 y ASIC2, con co-localización parcial de las mismas en los músculos del velo del paladar y del suelo de la boca investigados.

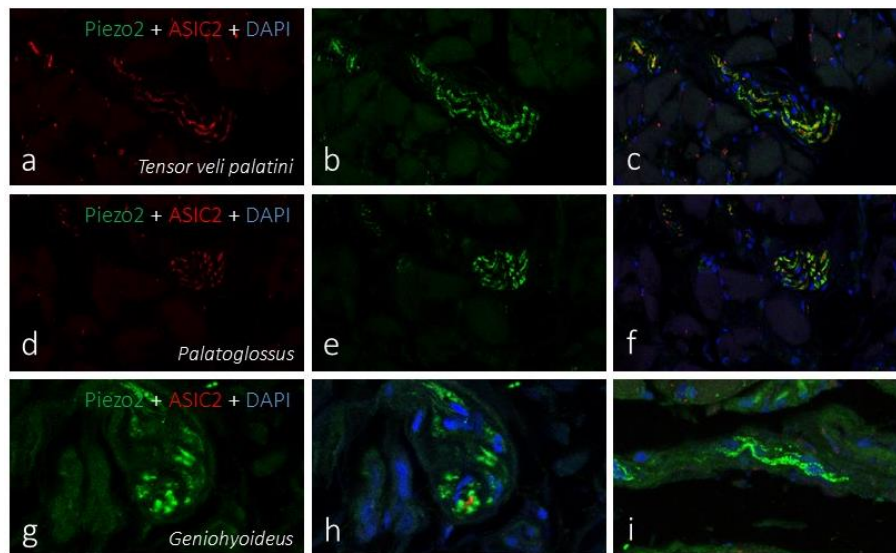


Figura 5.15.- Detección inmunohistoquímica de Piezo2 y ASIC2, con co-localización parcial de las mismas en los músculos del velo del paladar y de la lengua investigados.

La densidad (expresada en porcentajes) de propioceptores y fibras nerviosas que expresan y/o co-expresan Piezo2 y ASIC2 en los músculos analizados se recogen en la

Tabla 5.2.

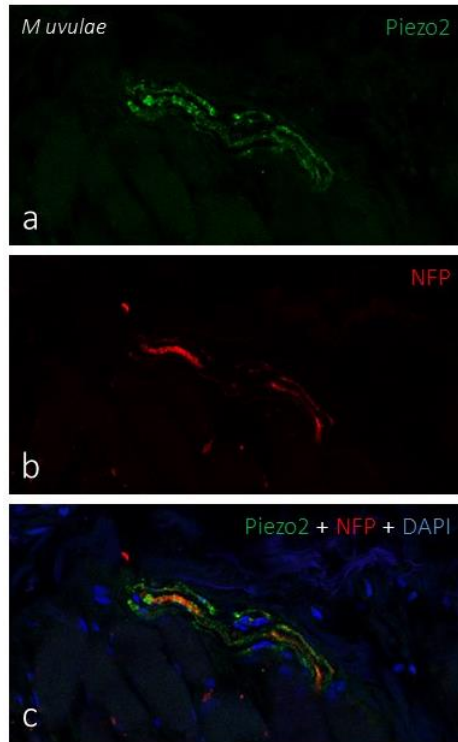


Figura 5.16.- Detección inmunohistoquímica de Piezo2 y ASIC2, con co-localización parcial de las mismas en los músculos del velo del paladar investigados.

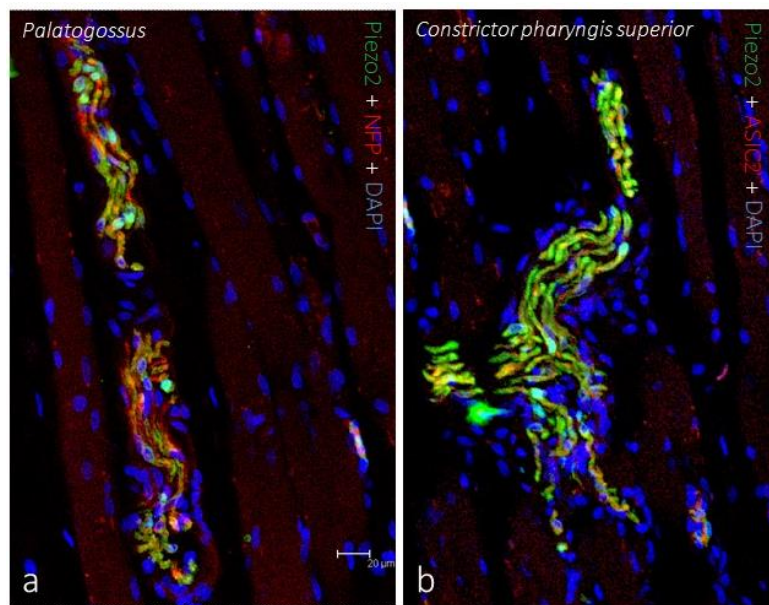


Figura 5.17.- Detección inmunohistoquímica de Piezo2 y ASIC2, con co-localización parcial de las mismas en los músculos palatogloso y constrictor superior de la faringe.

Tabla 5.2.- Porcentaje de husos neuromusculares y morfotipos de mecanorreceptores que expresan las proteínas Piezo2 y ASIC2 segregadas o separadas. Los datos se obtuvieron por conteo de 5 secciones por cada uno de los músculos con una separación entre los cortes de 200 µm. *Existen dudas acerca de la identificación del músculo. **Tercio superior; ***Tercio inferior

Músculo		Piezo2	ASIC2	Piezo2 + ASIC2
Territorio del nervio trigémino				
M. Masseter	HNM	81	86	81
	Tipo I	85	89	84
	Tipoll	90	87	91
	Tipo III	92	92	100
	Fibras 1	100	100	100
M. Pterygoideus lateralis	HNM	83	92	83
	Tipo I	85	81	84
	Tipoll	85	83	88
	Tipo III	93	94	94
	Fibras 1	90	92	89
Venter anterior m. dygastricus	HNM	100	91	91
	Tipo I	85	80	77
	Tipoll	75	73	84
	Tipo III	74	67	65
	Fibras 1	82	73	76
M. Mylohyoideus	HNM	100	100	100
	Tipo I	85	73	71
	Tipoll	86	62	63
	Tipo III	81	71	52
	Fibras 1	72	61	60
M. Tensor veli palatini	Tipo I	85	80	80
	Tipoll	82	77	73
	Tipo III	77	72	69
	Fibras 1	93	94	94
Territorio del nervio facial				
M. orbicularis oris	Tipo I	72	61	53
	Tipoll	55	33	29
	Tipo III	72	62	62
	Fibras 1	80	64	31
M. orbicularis oculi	Tipo I	33	22	16
	Tipoll	21	17	11
	Tipo III	19	20	17
	Fibras 1	36	17	22
M. zygomaticus maior	Tipo I	20	8	5
	Tipoll	11	6	3
	Tipo III	9	7	4
	Fibras 1	26	21	21
M. zygomaticus minor	Tipo I	82	42	40
	Tipoll	82	56	43
	Tipo III	91	62	47
	Fibras 1	16	9	11
M. levator labii superioris	Tipo I	79	45	38
	Tipoll	81	42	40
	Tipo III	83	54	47
	Fibras 1	12	11	8
M. platysma colli	HNM	100	100	93
	Tipo I	82	72	46

	Tipoll	83	46	24
	Tipo III	84	52	50
	Fibras 1	25	16	11
Territorio del nervio hipogloso				
M. genioglossus	HNM	100	100	100
	Tipo I	80	100	100
	Tipoll	72	100	100
	Tipo III	85	91	92
	Fibras 1	89	100	100
Territorio de los nervios glossofaríngeo y vago				
	Caps.	No Caps.	Fibras	
M. Palatoglossus	Tipo I	41	26	20
	Tipoll	53	41	32
	Tipo III	62	71	44
	Fibras 1	85	79	76
M. uvulae	Tipo I	31	52	26
	Tipoll	82	31	21
	Tipo III	81	40	22
	Fibras 1	39	33	37
M. constrictor pharyngis superior	Tipo I	93	88	90
	Tipoll	89	83	51
	Tipo III	91	81	84
	Fibras 1	90	72	88
M. constrictor pharyngis medius	Tipo I	86	74	81
	Tipoll	72	46	49
	Tipo III	92	73	83
	Fibras 1	87	81	88

5.4. Husos neuromusculares en ratones deficientes en NT3 y TrkC

El desarrollo de los husos neuromusculares de los mamíferos está regulado por la neurotrofina-3 (NT-3) y su receptor de alta afinidad TrkC. La acción se ejerce controlando la formación de las neuronas propioceptivas de los ganglios raquídeo que influyen en los mioblastos para determinar su fenotipo como células musculares intrafusales en lugar de rbdomiocitos. Sin embargo, no hay unanimidad de criterio entre los autores sobre si los músculos masticadores de los animales deficientes en NT-3 y TrkC desarrollan husos neuromusculares normales.

Los husos neuromusculares del músculo masetero de ratones wild type de 15 días están formados por cuatro fibras intrafusales de las que dos son del tipo de “cadena nuclear” y otras dos de tipo “saco nuclear”. Alrededor de las fibras se dispone un espacio más o menos amplio y el conjunto está rodeado por una

cápsula por la que penetran las fibras nerviosas que rodean las diferentes regiones de las fibras intrafusas y son diferenciables las sensitivas por la gran riqueza en mitocondrias que poseen (Figura 5.18).

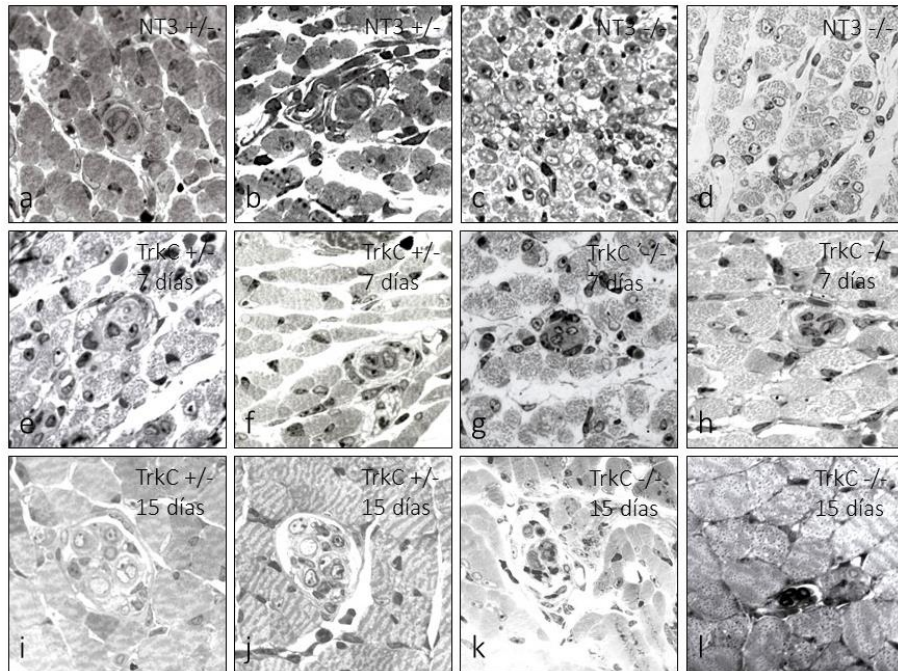


Figura 5.18.- Ultraestructura y estructura de los husos neuromusculares de los músculos masetero y pterigoideo lateral de ratones de diferentes edades deficientes en NT-3 y TrkC en grado de heterozigosis o de homozigosis.

En el análisis de los músculos cefálicos cabe destacar dos cosas: que nunca se han observado estructuras cuya morfología sea compatible con la de los husos neuromusculares en los músculos faciales; y que, como era de esperar, se han encontrado husos neuromusculares en los músculos inervados por el trigémino (masetero y pterigoideo) de animales de genotipo +/+ y +/-, nunca en los animales -/- de los animales deficientes en NT-3. Sin embargo, en los músculos de los animales con una mutación en TrkC, se han encontrado husos

neuromusculares en menor cantidad (en torno al 60%) y los que persisten tienen un aspecto degenerado (**Figura 5.18**).

Al estudiar la distribución de Piezo2 en estos animales, resultó tremendamente llamativo el hallazgo de la mecanoproteína directamente en las células musculares intrafusales de los animales deficientes en NT-3 y TrkC de 7 días (**Figura 5.19 a-f**), mientras que en los husos neuromusculares de los animales wild type y heterocigotos para TrkC se detectó positividad para Piezo2 solo en los nervios que suplen a los husos y en algunas fibras intrafusales (**Figura 5.19; h e i**).

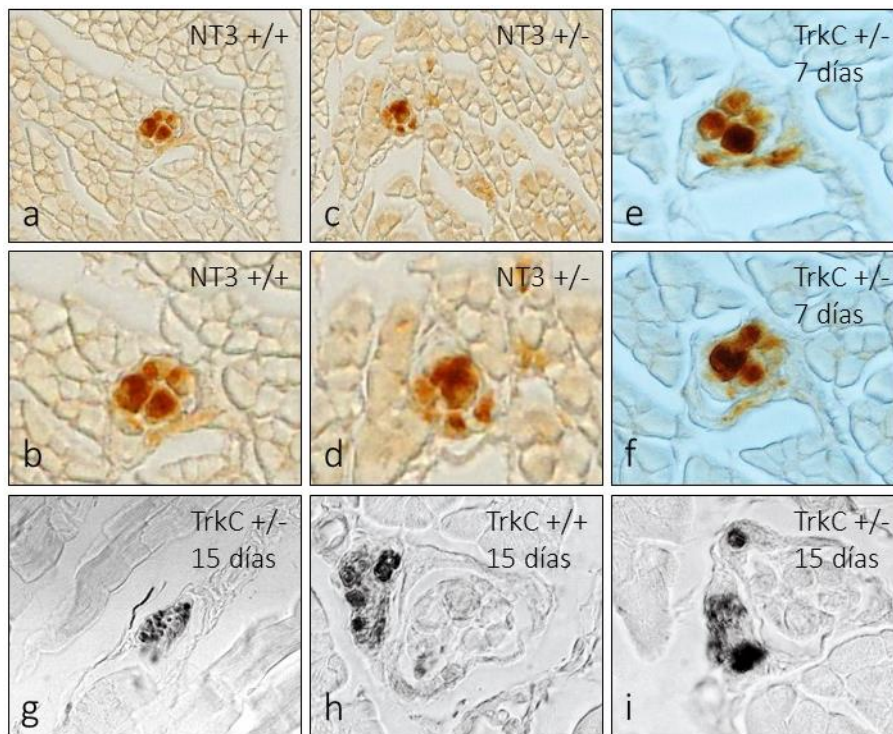


Figura 5.19.- Regiones de la cabeza de la que se obtuvieron las piezas de estudio y músculos estudiados en cada una de ellas. Cada una fue orientada antes de la inclusión en parafina para la identificación correcta de los músculos.

En ningún grupo de ratones se ha detectado la presencia de Piezo2 fuera de los husos neuromusculares, es decir, no existen estructuras Piezo2 positivas con posible

capacidad propioceptora capaces de suplirlos; no obstante en un caso único en un animal heterocigoto para TrkC (**Figura 5.19 g**) se detectó Piezo2 en una formación nerviosa extracorpúscular.

6. Discusión

6. DISCUSIÓN

6.1. Consideraciones generales, 73

El presente trabajo de Tesis Doctoral se realizó para analizar diferentes aspectos de la inervación propioceptiva de los músculos de la cabeza así como para establecer la presencia de mecanoproteínas en ellos con el fin de establecer el perfil inmunohistoquímico propioceptivo en ellos.

La mayor parte del material utilizado en el estudio fue de origen cadavérico humano, fijado y preservado para la realización de estudios anatómicos convencionales y no estudios de inervación microscópica, como en nuestro caso. Ello ha hecho que en ocasiones no se hayan preservado de la forma ideal los antígenos nerviosos investigados; o que los grupos aldehído del formaldehido empleado en la fijación enmascaren los epítomos que detectan los anticuerpos utilizados en la investigación; ni siquiera la recaptación antigénica consintió obviar este tipo de problemas. Es probable que los resultados que se han obtenido podrían haberse visto potenciados a incrementados con unas condiciones más adecuadas de tratamiento del material. Pero a paesar de ello, los datos que se obtienen siempre de los estudios sobre material humano son superiores a los del animal de experimentación, ya que no es necesaria la extrapolación de los mismos y en la mayoría de los casos los hallazgos experimentales solo son parcialmente trasladables al humano.

6.2. Los propioceptores cefálicos

Como se expuso claramente en el capítulo de Estado actual del problema, los músculos faciales carecen de husos neuromusculares, y su presencia nunca ha sido observada en la especie humana. Solo Kadanoff (1956) habla de la existencia de morfotipos muy variados en los músculos faciales humanos, que incluyen los husos neuromusculares.

En nuestro estudio nunca hemos encontrados husos neuromusculares típicos en los músculos craneofaciales inervados por el nervio facial, mientras que en los inervados por el trigémino (músculos masetero, pterigoideo interno y vientre anterior del digástrico) se han encontrado husos neuromusculares típicos.

Los husos neuromusculares de los músculos del territorio del trigémino están formados por un número variable de fibras intrafusales suplidas por fibras nerviosas en número variable. Nuestros hallazgos, con carácter general son superponibles a los de otros autores (Stål et al., 1987, 1990, 1994; Saverino et al., 2014). En la mayoría de los casos hemos podido marcar las fibras nerviosas en relación con estas formaciones sensitivas. Los marcadores generales utilizados marcan tanto las fibras motrices como las sensitivas pero los anticuerpos contra mecanoproteínas solo marcan una subpoblación que debe de asumirse que se trata de las fibras sensitivas propioceptoras. En nuestro estudio hemos localizado subpoblaciones de fibras Piezo2, ASIC2 y TRPV4 positivas. Estos hallazgos están en consonancia con lo aportado por diferentes autores que han detectado la presencia de proteínas ASIC en los husos neuromusculares (Chen y Wong, 2013) y otros que han establecido recientemente que Piezo2 es esencial para la propiocepción (Woo et al., 2015).

Hasta donde llegan nuestros datos este es el primer estudio que se realiza en humanos en el que se demuestra la presencia de fibras mecanorreceptoras, propioceptivas en relación con los husos neuromusculares. No obstante sería necesario poder disponer de mayor cantidad de muestras y en condiciones idóneas para poder demostrar con claridad la distribución de estas fibras y en el interior de los jutos y su relación exacta con las fibras musculares intrafusales, especialmente el tipo de terminaciones que forman (anuloespitales, hederiformes, etc ...).

En los músculos faciales inervados por el nervio facial, por el contrario, no se han observado husos neuromusculares típicos. Esta observación no es sorprendente ya que la mayoría de los autores consultados refieren que dichos músculos carecen de ellos. Pero sin embargo, en todos los músculos faciales analizados se han encontrado perfiles nerviosos, en densidades muy variables, que se organizan de una forma diferenciada a los troncos nerviosos y que en podrían constituir el aparato nervioso sensitivo muscular. Para poder etiquetarlos como estructuras sensitivas, seguramente de naturaleza mecanosensorial y presumiblemente propioceptora, hemos establecido una serie de criterios: morfológicos (estar más o menos capsulados), topográficos (disponerse en los tabiques musculares conectivos y nunca en el trayecto de los perfiles nerviosos) y, sobre todo, expresar inmunorreacción para alguna de las tres mecanoproteínas investigadas (ASIC2, Piezo2 y TRPV4).

En base a estas premisas se han establecido, además, tres morfotipos básicos de formaciones sensitivas en los músculos faciales, guiándonos sobre todo de criterios morfológicos. Seguramente será necesario volver a visitar este argumento más veces,

incluso desde la perspectiva de la anatomía comparada, para establecer si esta división es acertada o no.

Los receptores cutáneos se han propuesto como una fuente indirecta de propiocepción de los músculos faciales debido a las relaciones de estos con los tabiques conectivos que unen el SMAS con la dermis (Connor y Abbs, 1998; Collins et al., 2005; Macefield, 2005; Frayne et al., 2016a) aunque los estudios fisiológicos no apoyan esta opinión (Proske y Gandevia, 2012; Cattaneo y Pavesi, 2014). Desde un punto vista exclusivamente anatómico es difícil de asumir que los músculos faciales puedan intervenir en la propiocepción teniendo en cuenta la distancia que existe entre ambas estructuras, con independencia de los puentes fibrosos que existen entre la dermis y los músculos o el SMAS. Por tanto la propiocepción de los músculos faciales tiene que depender de estructuras sensitivas no identificadas aun, y se seguramente estén relacionadas con las descritas por Kadanoff (1956) hace 60 años utilizando técnicas de impregnación argéntica.

En la actualidad no existen investigaciones centradas en el estudio de la propiocepción de los músculos faciales. En nuestro trabajo se ha demostrado que dichos músculos contienen un aparato nervioso muy denso con diferentes tipos de formaciones nerviosas sensitivas. La mayoría de ellas son de tipo Ruffini-like, pero también existen otras de difícil catalogación desde un punto de vista morfológico. Lo que no deja de ser sorprendente es el alto parecido de algunas de nuestras imágenes con las de Kadanoff.

De cualquier manera, lo que confirma la naturaleza sensitiva de estas estructuras es la presencia en ellas de inmunorreacción para proteínas mecánicas, y que algunas de ellas ya han sido detectadas previamente en mecanorreceptores cutáneos (Cabo et al., 2015; Alonso-González et al., 2016), e incluso en los husos neuromusculares (Gautan y Benson, 2013; Woo et al., 2015).

Por otro lado, aunque los músculos faciales carecen de propioceptores típicos, la agudeza de la propiocepción facial es superior a la mandibular (Frayne et al., 2016a, b), por lo que consideramos que el aparato nervioso sensitivo descrito y su densidad es suficiente para suplir con ventaja a los husos neuromusculares.

La propiocepción en los músculos faciales es de importancia capital para coordinar los movimientos faciales (van der Bilt, 2011; Schötz et al., 2013), en la elaboración de determinados reflejos (May, 2002) y funcionan en conjunción con los con los músculos masticadores en la elaboración del lenguaje, tragar o la comunicación no verbal (Wild et al., 2003; Kang et al., 2005; Hontanilla et al., 2013), parece evidente que deben de existir formaciones sensitivas en los mismos que los suplan. Una Buena parte de nuestra investigación se ha centrado en la identificación y caracterización de estas formaciones.

6.3. Mecanoproteínas y propiocepción

Las dos mecanoproteínas que hasta la fecha se han puesto en relación con la mecanotransducción en los husos neuromusculares son Piezo2 y ASIC2, aunque solo la primera ha demostrado de manera eficiente que es la auténtica mecanotransductora. Un subconjunto de neuronas mecanosensibles de los ganglios raquídeos DRG son

propioceptoras que se caracterizan por la expresión de la proteína ligante del calcio parvalbumina (Pvalb) (Arber et al., 2000). Los propioceptores son mecanorreceptores de bajo umbral y adaptación lenta que inervan los husos neuromusculares y los órganos tendinosos de Golgi (Proske y Gandevia, 2012; Proske, 1015). El estudio de Woo et al. (2015) demostró que Piezo2 es el principal mecanotransductor en los husos neuromusculares del ratón. Estos autores utilizaron dos cepas condicionales de ratón knockout para Piezo2 que carecían de propioceptores parvalbumina-positivos. Los animales mostraron un profundo deterioro de la coordinación en las extremidades y alteraciones en el funcionamiento de los husos neuromusculares. Recientemente, un elegante estudio del grupo Ana Gomis corroboró estos hallazgos utilizando neuronas propioceptivas del núcleo mesencefálico (Florez-Paz et al., 2016). Nosotros hemos demostrado en este trabajo que tanto los propioceptores típicos como los atípicos de los músculos cefálicos expresan y co-expresan ambas proteínas.

Teniendo en cuenta que desde un punto de vista funcional los corpúsculos de Meissner y Pacini son de adaptación rápida y los complejos Merkel-neurita se comportan como mecanorreceptores de adaptación lenta nuestros resultados sugieren que Piezo2 es necesario para la mecanotransducción independientemente del tipo de adaptación que tengan las formaciones nerviosas sensitivas que las expresen (ver Florez-Paz et al., 2016).

6.4. Regulación del desarrollo de los propioceptores

Las neurotrofinas (NTs) son una familia de factores de crecimiento relacionados estructural y funcionalmente que poseen propiedades neurotróficas y neurotrópicas

(Barbacid, 1995; Lewin y Barde, 1996). La familia de las NTs incluye, en los mamíferos, el factor de crecimiento nervioso (nerve growth factor, NGF), el factor de crecimiento derivado del cerebro (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), y las neurotrofinas (NT) 3, (NT-3), NT-4/5 and NT-6 (Barbacid, 1995; Reichardt y Fariñas, 1997).

En conjunto, estas moléculas controlan el desarrollo, diferenciación y mantenimiento fenotípico de algunas poblaciones neuronales de los ganglios raquídeos (ver Montaña et al., 2010). Las neurotrofinas actúan sobre las células que responden a ellas uniéndose a proteínas específicas de la membrana celular que funcionan como receptores de alta (proteínas Trk: TrkA, TrkB y TrkC) y baja (proteína p75) afinidad (Lewin y Barde, 1996; Reichardt 2001) TrkA es el receptor primario para NGF, TrkB para BDNF y NT-4/5 y TrkC es el receptor de NT-3.

El complejo TrkC-NT-3 ha sido implicado en la propiocepción (Ernfors y Cols., 1994; Fariñas y Cols., 1994; Klein y Cols., 1994; Tessarollo y Cols., 1994; Oakley y Cols., 1997; Wright y Cols., 1997) al menos a nivel de la médula espinal, aunque no de una forma tan clara en el sistema del núcleo mesencefálico del trigémino (Kucera y Cols., 1998).

En el presente trabajo se ha demostrado que los músculos masticadores del ratón contienen husos neuromusculares normales, ya identificables desde el momento del nacimiento mientras que en los animales deficientes en NT-3 no se han encontrado husos pero si estructuras en proceso de degeneración que posiblemente correspondan con los husos degenerados. En los animales deficientes en TrkC, analizados a los 15 días de vida no hay husos neuromusculares.

El fenotipo nervioso de los animales deficientes en NT-3 se caracteriza por una reducción en el número de neuronas sensitivas en los ganglios del trigémino (60%) y en los raquídeos (en torno al 60%). Asociado a este déficit neuronal, en el caso de los ganglios espinales se produce una desaparición de los propioceptores musculares periféricos (Fariñas y Cols., 1994; Kucera y Cols., 1995). Sin embargo, en el sistema neuromuscular dependiente del ganglio de Gasser y del núcleo mesencefálico del trigémino no existen estas alteraciones y en los músculos masticadores de los animales carentes de NT-3 se desarrollan normalmente los husos neuromusculares (Kucera y Cols., 1998). Este hecho está en completa contradicción con los resultados del presente trabajo ya que en nuestro caso se ha observado que los animales que carecen del sistema NT-3/TrkC carecen de husos neuromusculares, si bien es cierto que los datos sugieren que primero se diferencian y posteriormente se atrofian y desaparecen. Los trabajos antes mencionados posiblemente no tuvieron en consideración las formaciones aberrantes observadas en nuestro estudio y esa puede ser la causa de las discrepancias.

6.4. Limitaciones del estudio y futuras investigaciones

Aunque, con carácter general, puede afirmarse que se han logrado todos los objetivos del estudio, es evidente que algunos aspectos del mismo han quedado incompletos.

En primer lugar, las disecciones del nervio facial sería conveniente realizarlas sobre las piezas cadavéricas y a poder ser material fresco. Sólo así se podría proceder al aislamiento adecuado de la estratigrafía de la cada y del SMAS y se podría ver claramente el curso de los nervios facial y trigémino con respecto a él.

Otro aspecto que ha quedado sólo parcialmente resuelto, y que también debe de ser atribuido a las características y condiciones de preservación del material humano

utilizado, es el de la inervación sensitiva de la cara. Si como muchos autores afirman la cara tiene una gran inervación sensitiva y nosotros no hemos logrado ponerla de manifiesto es porque el material no era idóneo para este tipo de estudios. No puede ser atribuido a defectos en la técnica ya que en las mismas piezas si se ha logrado poner de manifiesto el aparato nervioso muscular y las células de Merkel. Creemos que el mantenimiento de las piezas durante largo tiempo en formol produjo alteraciones en los epítomos que detectan los anticuerpos utilizados que los hace indetectables mediante inmunohistoquímica.

Finalmente, consideramos que la identificación de las ramas más periféricas de los nervios cuando están incluidos en tejidos blandos, como en el de los nervios trigémino y facial en la cara, podrá ser resuleto sólo cuando se desarrollen técnicas de imagen con mayor capacidad de resolución. Poder disponer de un mapa rediológico de los nervios de la cara impedirá en el futuro que se lesiones en las manipulaciones de la misma.

Aunque son necesarios más estudios para profundizar en estos resultados y poder demostrar de manera clara la posible trascendencia práctica de los mismos, seguramente son de interés para futuras intervenciones de cirugía de la cara en la que sea necesario preservar la propiocepción como en el caso de los trasplantes de cara (Roche et al., 2015; Russo et al., 2016), en la cirugía de la parálisis facial cosmética o reconstructiva (Hassoouneh et al., 2015), en las intervenciones faciales mínimamente invasivas como los tratamientos con toxina botulínica (Commader et al., 2016; Dickey et al., 2016; Jia et al., 2016; Meaike et al., 2016) e incluso para el tratamiento de la depresión (Finzi y Rosenthal, 2016).

Un aspecto que merece la pena reinvestigar más adelante es tratar de diferenciar en los extremos terminales de las ramas del nervio facial que fibras son sensitivas y cuales son motoras, y poder establecer la proporción de las mismas. Con las técnicas actuales este tipo de estudios resultan casi imposibles en humanos. Pero seguramente en los próximos años la utilización de anticuerpos específicos contra proteínas exclusivamente motoras o sensitivas podría arrojar luz sobre este aspecto.

Y en un futuro inmediato, sobre material humano en mejores condiciones de preservación, volveremos a investigar la inervación sensitiva de la piel de la cara. Nuestro grupo de trabajo posee una amplia experiencia en el análisis de las formaciones nerviosas sensitivas periféricas y estamos en disposición de arrojar luz sobre este aspecto si disponemos del material adecuado.

7. Conclusiones

7. CONCLUSIONES

Tras el análisis detallado de los datos obtenidos de la experimentación y de la oportuna discusión de los mismos con los datos existentes en la literatura científica, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- 1.- Los músculos cefálicos estudiados inervados por el nervio trigémino (masetero, perigoideo externo, milohioideo, vientre anterior del digástrico y tensor del velo del paladar) presentan husos neuromusculares típicos; no se han detectado en el músculo elevador del velo del paladar.
- 2.- Se han observado husos neuromusculares morfológicamente identificables en los músculos platisma del cuello (correspondiente al territorio del nervio facial), en densidades altas, y uno en el músculo geniogloso (correspondiente al territorio del nervio hipogloso).
- 3.- En el resto de los músculos estudiados, carentes de propioceptores típicos, se ha identificado un aparato nervioso muy desarrollado, que se organiza en estructuras nerviosas capsuladas, parcialmente capsuladas y acapsuladas, de morfología muy variable, que por su perfil pueden identificarse como propioceptores atípicos. Su densidad varía de unos músculos a otros.
- 4.- Los músculos constrictores de la faringe presentan formaciones espiroideas típicas y propias con el perfil inmunohistoquímico de propioceptores.
- 5.- La mayoría de los os propioceptores típicos y atípicos de los músculos cefálicos tienen fibras nerviosas Piezo2 positivas, en menor proporción fibras nerviosas ASIC2 positivas, y en un porcentaje variable ambas mecanoproteínas se expresan

en la misma formación sensitiva confirmando a nivel molecular que se trata de propioceptores.

6.- El sistema de las neurotrofinas neurotrofina-3/TrkC regula el desarrollo de los husos neuromusculares del territorio del nervio trigémino. La mutación no funcional en el gen que codifica para neurotrofina-3 resulta en la ausencia completa de husos neuromusculares, mientras que la ausencia de TrkC resulta en una menor densidad de husos neuromusculares que además son atróficos. No se han detectado, ni morfológicamente ni a nivel inmunohistoquímico, propioceptores atípicos en los animales deficientes en neurotrofina-3/TrkC.

8. Bibliografia

8. BIBLIOGRAFIA

- Ackerley R, Watkins RH. Microneurography as a tool to study the function of individual C-fiber afferents in humans: responses from nociceptors, thermoreceptors, and mechanoreceptors. *J Neurophysiol.* 2018; 120: 2834-46.
- Ackermann PW, Salo P, Hart DA. Tendon Innervation. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 920:35-51.
- Akay T, Tourtellotte WG, Arber S, Jessell TM. Degradation of mouse locomotor pattern in the absence of proprioceptive sensory feedback. *PNAS USA.* 2014; 111:16877-82.
- Alisch F, Weichert A, Kalache K, Paradiso V, Longardt AC, Dame C, Hoffmann K, Horn D. Familial Gordon syndrome associated with a PIEZO2 mutation. *Am J Med Genet A.* 2017; 173: 254-9.
- Alper SL. Genetic Diseases of PIEZO1 and PIEZO2 Dysfunction. *Curr Top Membr.* 2017; 79:97-134.
- Anderson EO, Schneider ER, Bagriantsev SN. Piezo2 in Cutaneous and Proprioceptive Mechanotransduction in Vertebrates. *Curr Top Membr.* 2017; 79: 197-217.
- Andreatta RD, Barlow SM. Somatosensory gating is dependent on the rate of force recruitment in the human orofacial system. *J Speech Lang Hear Res* 2009; 52:1566-78.
- Arber S, Ladle DR, Lin JH, Frank E, Jessell TM. ETS gene Er81 controls the formation of functional connections between group Ia sensory afferents and motor neurons. *Cell.* 2000; 101:485-98.
- Banks RW. The innervation of the muscle spindle: a personal history. *J Anat.* 2015; 227:115-35.
- Bagriantsev SN, Gracheva EO, Gallagher PG. Piezo proteins: regulators of mechanosensation and other cellular processes. *J Bio. Chem.* 2014; 289: 31673-81.
- Baumel J. Trigeminal-facial nerve communications. *Arch Otolaryngol* 1974; 99: 34-44.
- Bewick GS, Banks RW. Mechanotransduction in the muscle spindle. *Pflugers Arch.* 2015; 467:175-90.
- Bossy J, Vidić B. Does proprioceptive innervation of the muscles of the pharynx exist in man? *Arch Anat Histol Embryol.* 1967; 50:273-84.

- Brennan PA, Elhamshary AS, Alam P, Anand R, Ammar M. Anastomosis between the transverse cervical nerve and marginal mandibular nerve: how often does it occur? *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2017; 55:293-5.
- Blecher R, Heinemann-Yerushalmi L, Assaraf E, Konstantin N, Chapman JR, Cope TC, Bewick GS, Banks RW, Zelzer E. New functions for the proprioceptive system in skeletal biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2018; 373 (1759). pii: 20170327.
- Butler AA, Héroux ME, Gandevia SC. Body ownership and a new proprioceptive role for muscle spindles. *Acta Physiol (Oxf)* 2016; 220: 19-27.
- Cattaneo L, Pavesi G. The facial motor system. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014; 38:135-59.
- Chen CC, Wong CW. Neurosensory mechanotransduction through acid-sensing ion channels. *J Cell Mol Med*. 2013; 17:337-349.
- Chesler AT, Szczot M, Bharucha-Goebel D, Čeko M, Donkervoort S, Laubacher C, Hayes LH, Alter K, Zampieri C, Stanley C, Innes AM, Mah JK, Grosmann CM, Bradley N, Nguyen D, Foley AR, Le Pichon CE, Bönnemann CG. The Role of PIEZO2 in Human Mechanosensation. *N Engl J Med*. 2016; 375:1355-64.
- Choi HJ, Sun D, Jakobs TC. Astrocytes in the optic nerve head express putative mechanosensitive channels. *Molecular Vision*. 2015; 21:749-66.
- Cobo JL. Neuroanatomía de la cara. Anatomía topográfica, quirúrgica, radiológica y microscópica de la inervación de la cara. Tesis Doctoral. Oviedo: Universidad de Oviedo; 2016.
- Cobo JL, Abbate F, de Vicente JC, Cobo J, Vega JA. Searching for proprioceptors in human facial muscles. *Neurosci Lett*. 2017a; 640:1-5.
- Cobo JL, Solé-Magdalena A, Menendez I, De Vicente JC, Vega JA. Connections between the facial and trigeminal nerves: Anatomical basis for facial muscle proprioception. *JPRAS Open* 2017b; 12: 9-18.
- Cobo JL, Solé-Magdalena A, Junquera S, Cobo T, Vega JA, Cobo J. The proprioception in the muscles supplied by the facial nerve. En: *Selected Topics in Facial Nerve Disorders*, I Al-Zwaini y M Jalal Hussein (Eds). Intech, London, 2019; pp. 1-14.
- Connor NP, Abbs JH. Orofacial proprioception: analyses of cutaneous mechanoreceptor population properties using artificial neural networks. *J Commun Disord* 1998; 31: 535-42; 553.

- Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Patapoutian A. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science*. 2010; 330: 55-60.
- Coste B, Murthy SE, Mathur J, Schmidt M, Mechoukhi Y, Delmas P, Patapoutian A. Piezo1 ion channel pore properties are dictated by C-terminal region. *Nat Commun*. 2015; 6:7223.
- de Carlos F, Cobo J, Macías E, Feito J, Cobo T, Calavia MG, García-Suárez O, Vega JA. The sensory innervation of the human pharynx: searching for mechanoreceptors. *Anat Rec (Hoboken)*. 2013; 296:1735-46.
- Diamond M, Wartmann CT, Tubbs RS, Shoja MM, Cohen-Gadol AA, Loukas M. Peripheral facial nerve communications and their clinical implications. *Clin Anat*. 2011; 24:10-8.
- Dijkerman HC, de Haan EH. Somatosensory processes subserving perception and action. *Behav Brain Sci*. 2007; 30:189-201.
- Ellaway PH, Taylor A, Durbaba R. Muscle spindle and fusimotor activity in locomotion. *J Anat*. 2015; 227:157-66.
- Fariñas I, Jones KR, Backus C, Wang XY, Reichardt LF. Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3. *Nature*. 1994; 369: 658-61.
- Ferrari LF, Bogen O, Green P, Levine JD. Contribution of Piezo2 to endothelium-dependent pain. *Molecular Pain*. 2015; 11:65.
- Florez-Paz D, Bali KK, Kuner R, Gomis A. A critical role for Piezo2 channels in the mechanotransduction of mouse proprioceptive neurons. *Sci Rep*. 2016; 6:25923.
- Frayne E, Coulson S, Adams R, Croxson G, Waddington G. Proprioceptive ability at the lips and jaw measured using the same psychophysical discrimination task. *Exp Brain Res* 2016; 234:1679-87.
- García-Mesa Y, García-Piqueras J, García B, Feito J, Cabo R, Cobo J, Vega JA, García-Suárez O. Merkel cells and Meissner's corpuscles in human digital skin display Piezo2 immunoreactivity. *J Anat*. 2017; 231:978-89.
- García-Piqueras J, García-Mesa Y, Cárcaba L, Feito J, Torres-Parejo I, Martín-Biedma B, Cobo J, García-Suárez O, Vega JA. Ageing of the somatosensory system at the periphery: age-related changes in cutaneous mechanoreceptors. *J Anat*. 2019; 234: 839-52.

- Gautam M, Benson CJ. Acid-sensing ion channels (ASICs) in mouse skeletal muscle afferents are heteromers composed of ASIC1a, ASIC2, and ASIC3 subunits. *FASEB J*. 2013; 27:793-802.
- Ge J, Li W, Zhao Q, Li N, Chen M, Zhi P, Li R, Gao N, Xiao B, Yang M. Architecture of the mammalian mechanosensitive Piezo1 channel. *Nature*. 2015; 527: 64-9.
- Goodmurphy CW, Ovalle WK. Morphological study of two human facial muscles: orbicularis oculi and corrugator supercilii. *Clin Ant*. 1999; 12: 1-11.
- Haliloglu G, Becker K, Temucin C, Talim B, Küçükşahin N, Pergande M, Motameny S, Nürnberg P, Aydingoz U, Topaloglu H, Cirak S. Recessive PIEZO2 stop mutation causes distal arthrogryposis with distal muscle weakness, scoliosis and proprioception defects. *J Hum Genet*. 2017; 62:497-501.
- Happak W, Burggasser G, Liu J, Gruber H, Freilinger G. Anatomy and histology of the mimic muscles and the supplying facial nerve, *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1994; 1994: S85-S86.
- Honore E Martins JR, Penton D, Patel, A, Demolombe S. The piezo mechanosensitive ion channels: May the force be with you! *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*. 2015; 169: 25-41.
- Heppelmann B. Anatomy and histology of joint innervation. *J Peripher Nerv Syst*. 1997; 2: 5-16.
- Huang H, Bae C, Sachs F, Suchyna TM. Caveolae regulation of mechanosensitive channel function in myotubes. *PLoS One*. 2013; 8:e72894.
- Hunt CC, Wilkinson RS, Fukami Y. Ionic basis of the receptor potential in primary endings of mammalian muscle spindles. *J Gen Physiol*. 1978; 71:683-98.
- Hwang K, Yang SC, Song JS. Communications Between the Trigeminal Nerve and the Facial Nerve in the Face: A Systematic Review. *J Craniofac Surg*. 2015; 26:1643-6.
- Ikeda R, Cha M, Ling J, Jia Z, Coyle D, Gu JG. Merkel cells transduce and encode tactile stimuli to drive A β -afferent impulses. *Cell* 2014; 157:664-75.
- Kadanoff D. Die sensiblen Nervendigungen in der mimischen Muskulatur des Menschen, *Z Mikrosk Anat Forsch*. 1956; 62: 1-15.
- Kamen G, De Luca CJ. Firing rate interactions among human orbicularis oris motor units. *Int J Neurosci*. 1992; 64: 167-75.

- Khatibi Shahidi M, Krivanek J, Kaukua N, Ernfors P, Hladik L, Kostal V, Masich S, Hampl A, Chubanov V, Gudermann T, Romanov RA, Harkany T, Adameyko I, Fried K. Three-dimensional Imaging Reveals New Compartments and Structural Adaptations in Odontoblasts. *J Dent Res*. 2015; 94:945-54.
- Kistemaker DA, Van Soest AJ, Wong JD, Kurtzer I, Gribble PL. Control of position and movement is simplified by combined muscle spindle and Golgi tendon organ feedback. *J Neurophysiol*. 2013; 109:1126-39.
- Kröger S. Proprioception 2.0: novel functions for muscle spindles. *Curr Opin Neurol*. 2018; 31:592-8.
- Kucera J, Fan G, Walro J, Copray S, Tessarollo L, Jaenisch R. Neurotrophin-3 and trkC in muscle are non-essential for the development of mouse muscle spindles. *Neuroreport*. 1998; 9:905-9.
- Kuehn DP, Templeton PJ, Maynard JA. Muscle spindles in the velopharyngeal musculature of humans. *J Speech Hear Res*. 1990; 33: 488-93.
- Kwak HH, Park HD, Youn KH, Hu KS, Koh KS, Han SH, Kim HJ. Branching patterns of the facial nerve and its communication with the auriculotemporal nerve. *Surg Radiol Anat* 2004; 6:494-500.
- Lazarov NE. Neurobiology of orofacial proprioception. *Brain Res Rev* 2007; 56: 362-83.
- Lee CH, Chen CC. Roles of ASICs in Nociception and Proprioception. *Adv Exp Med Biol*. 2018; 1099:37-47.
- Lee W, Leddy HA, Chen Y, Lee SH, Zelenski NA, McNulty AL, Wu J, Beicker KN, Coles J, Zauscher S, Grandl J, Sachs F, Guilak F, Liedtke WB. Synergy between Piezo1 and Piezo2 channels confers high-strain mechanosensitivity to articular cartilage. *PNAS USA* 2014; 111: E5114–E5122.
- Li J, Hou B, Tumova S, Muraki K, Bruns A, Ludlow MJ, Sedo A, Hyman AJ, McKeown L, Young RS, Yuldasheva NY, Majeed Y, Wilson LA, Rode B, Bailey MA, Kim HR, Fu Z, Carter DA, Bilton J, Imrie H, Ajuh P, Dear TN, Cubbon RM, Kearney MT, Prasad RK, Evans PC, Ainscough JF, Beech DJ. Piezo1 integration of vascular architecture with physiological force. *Nature*. 2014; 515:279-82.
- Liss JM. Muscle spindles in the human levator veli palatini and palatoglossus muscles. *J Speech Hear Res*. 1990; 33:736-46.

- Mahmud AA, Nahid NA, Nassif C, Sayeed MS, Ahmed MU, Parveen M, Khalil MI, Islam MM, Nahar Z, Rypens F, Hamdan FF, Rouleau GA, Hasnat A, Michaud JL. Loss of the proprioception and touch sensation channel PIEZO2 in siblings with a progressive form of contractures. *Clin Genet*. 2017; 91:470-5.
- Maksimovic S, Nakatani M, Baba Y, Nelson AM, Marshall KL, Wellnitz SA, Firozi P, Woo SH, Ranade S, Patapoutian A, Lumpkin EA. Epidermal Merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors. *Nature*. 2014; 509:617-21.
- Martinac B. The ion channels to cytoskeleton connection as potential mechanism of mechanosensitivity. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1838:682-91.
- Matsuo S, Ichikawa H, Silos-Santiago I, Arends JJ, Henderson TA, Kiyomiya K, Kurebe M, Jacquin MF. Proprioceptive afferents survive in the masseter muscle of *trkC* knockout mice. *Neuroscience*. 2000; 95:209-16.
- May A, Bramke S, Funk RHW, May CA. The human platysma contains numerous muscle spindles. *J Anat*. 2018; 232: 146-51.
- McMillin MJ, Beck AE, Chong JX, Shively KM, Buckingham KJ, Gildersleeve HI, Aracena MI, Aylsworth AS, Bitoun P, Carey JC, Clericuzio CL, Crow YJ, Curry CJ, Devriendt K, Everman DB, Fryer A, Gibson K, Giovannucci Uzielli ML, Graham JM Jr, Hall JG, Hecht JT, Heidenreich RA, Hurst JA, Irani S, Krapels IP, Leroy JG, Mowat D, Plant GT, Robertson SP, Schorry EK, Scott RH, Seaver LH, Sherr E, Splitt M, Stewart H, Stumpel C, Temel SG, Weaver DD, Whiteford M, Williams MS, Tabor HK, Smith JD, Shendure J, Nickerson DA; University of Washington Center for Mendelian Genomics, Bamshad MJ. Mutations in *PIEZO2* cause Gordon syndrome, Marden-Walker syndrome, and distal arthrogyriposis type 5. *Am J Hum Genet*. 2014; 94:734-44.
- Meng F, Sachs F. Measuring strain of structural proteins in vivo in real time. En: Kohl P, Sachs F, Franz MR, editors. *Cardiac Mechano-Electric Coupling and Arrhythmia: From Pipette to Patient*. Oxford: Oxford University Press; 2011. pp. 431-4.
- Meng F, Sachs F. Orientation-based FRET sensor for real-time imaging of cellular forces. *J Cell Sci*. 2012; 125:743-50.
- Miller AJ. 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*. 2002; 13:409-25

- Moe P, Blount P. Assessment of potential stimuli for mechano-dependent gating of MscL: effects of pressure, tension, and lipid headgroups. *Biochemistry*. 2005; 44:12239-44.
- Morris CE. Voltage-gated channel mechanosensitivity: fact or friction? *Front Physiol*. 2011; 2:25. 40.
- Morris CE. Why are so many ion channels mechanosensitive? In: Sperelakis N, editor. *Cell Physiology Source Book*. Elsevier; 2012. pp. 493-505.
- Mu L, Sanders I. Neuromuscular specializations within human pharyngeal constrictor muscles. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2007; 116:604-17.
- Namking M, Boonruangsri P, Woraputtaporn W, G€uldner FH. 1994 Communication between the facial and auriculotemporal nerves. *J Anat* 185:421-26.
- Oakley RA, Garner AS, Large TH, Frank E. Muscle sensory neurons require neurotrophin-3 from peripheral tissues during the period of normal cell death. *Development*. 1995; 121:1341-50.
- Oakley RA, Lefcort FB, Clary DO, Reichardt LF, Prevet D, Oppenheim RW, Frank E. Neurotrophin-3 promotes the differentiation of muscle spindle afferents in the absence of peripheral targets. *J Neurosci*. 1997; 17:4262-74.
- Osterlund C, Liu JX, Thornell LE, Eriksson PO. Muscle spindle composition and distribution in human young masseter and biceps brachii muscles reveal early growth and maturation. *Anat Rec (Hoboken)* 2011; 294:683-93.
- Pilurzi G, Ginatempo F, Mercante B, Cattaneo L, Pavesi G, Rothwell JC, Deriu F. Role of cutaneous and proprioceptive inputs in sensorimotor integration and plasticity occurring in the facial primary motor cortex. *J Physiol*. 2019. doi: 10.1113/JP278877.
- Proske U. The role of muscle proprioceptors in human limb position sense: a hypothesis. *J Anat*. 2015; 227:178-83.
- Proske U, Gandevia SC. The proprioceptive senses: their roles in signaling body shape, body position and movement, and muscle force. *Physiol Rev*. 2012; 92:1651-97.
- Ranade SS, Woo SH, Dubin AE, Moshourab RA, Wetzel C, Petrus M, Mathur J, Bégay V, Coste B, Mainquist J, Wilson AJ, Francisco AG, Reddy K, Qiu Z, Wood JN, Lewin GR, Patapoutian A. Piezo2 is the major transducer of mechanical forces for touch sensation in mice. *Nature*. 2014; 516:121-5.

- Ridone P, Vassalli M, Martinac B. Piezo1 mechanosensitive channels: what are they and why are they important. *Biophys Rev.* 2019; 11: 795-805.
- Sachs F. Mechanical transduction by ion channels: A cautionary tale. *World J Neurol.* 2015; 5: 74-87.
- Saverino D, De Santanna A, Simone R, Cervioni S, Cattrysse E, Testa M. Observational study on the occurrence of muscle spindles in human digastric and mylohyoid muscles. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 294263.
- Scutter SD, Türker KS. The role of the muscle spindles in human masseter. *Hum Mov Sci.* 2001; 20: 489-97.
- Sengupta BN, Sengupta S. Muscle spindles in the inferior constrictor pharyngis muscle of the crab-eating monkey (*Macaca irus*). *Acta Anat (Basel)* 1978; 100(1):132-5.
- Seto H. Studies on the sensory innervation (Human sensibility). Igoku Shoin Ltd, Tokyo, 1963; 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.
- Shoja MM, Oyesiku NM, Griessenauer CJ, Radcliff V, Loukas M, Chern JJ, Benninger B, Rozzelle CJ, Shokouhi G, Tubbs RS. Anastomoses between lower cranial and upper cervical nerves: a comprehensive review with potential significance during skull base and neck operations, part I: trigeminal, facial, and vestibulocochlear nerves. *Clin Anat.* 2014a; 27:118-30.
- Shoja MM, Oyesiku NM, Shokouhi G, Griessenauer CJ, Chern JJ, Rizk EB, Loukas M, Miller JH, Tubbs RS. A comprehensive review with potential significance during skull base and neck operations, Part II: glossopharyngeal, vagus, accessory, and hypoglossal nerves and cervical spinal nerves 1-4. *Clin Anat.* 2014b; 27: 131-44.
- Simon A, Shenton F, Hunter I, Banks RW, Bewick GS. Amiloride-sensitive channels are a major contributor to mechanotransduction in mammalian muscle spindles, *J Physiol.* 2010; 588: 171-85.
- Soattin L, Fiore M, Gavazzo P, Viti F, Facci P, Raiteri R, Difato F, Pusch M, Vassalli M. The biophysics of piezo1 and piezo2 mechanosensitive channels. *Biophys Chem.* 2016; 208:26-33.

- Stål P, Eriksson PO, Eriksson A, Thornell LE. Enzyme-histochemical differences in fibre-type between the human major and minor zygomatic and the first dorsal interosseus muscles, *Arch Oral Biol.* 1987; 32: 833-41.
- Stål P, Eriksson PO, Eriksson A, Thornell LE. Enzyme-histochemical and morphological characteristics of muscle fibre types in the human buccinator and orbicularis oris, *Arch Oral Biol.* 1990; 35: 449-58.
- Suchyna TM, Markin VS, Sachs F. Biophysics and structure of the patch and the gigaseal. *Biophys J.* 2009; 97:738-47.
- Suchyna TM, Sachs F. Mechanosensitive channel properties and membrane mechanics in mouse dystrophic myotubes. *J Physiol.* 2007; 581:369-87.
- Suchyna T, Sachs F. The Membrane/Cytoskeleton Interface and Stretch-Activated Channels. In: Kohl P, Sachs F, Franz MR, editors. *Cardiac Mechano-Electric Coupling and Arrhythmia: From Pipette to Patient.* Oxford, UK: Oxford University Press; 2011. pp. 57-65.
- Taberner FJ, Prato V, Schaefer I, Schrenk-Siemens K, Heppenstall PA, Lechner SG. Structure-guided examination of the mechanogating mechanism of PIEZO2. *Proc Natl Acad Sc. USA* 2019; 116: 14260-9.
- Vega JA. Propioceptores articulares y musculares. *Biomecanica* 1999; 13: 79-93.
- Verma D, Ye N, Meng F, Sachs F, Rahimzadeh J, Hua SZ. Interplay between cytoskeletal stresses and cell adaptation under chronic flow. *PLoS One.* 2012; 7: e44167.
- Wang F, Knutson K, Alcaïno C, Linden DR, Gibbons SJ, Kashyap P, Grover M, Oeckler R, Gottlieb PA, Li HJ, Leiter AB, Farrugia G, Beyder A. Mechanosensitive ion channel Piezo2 is important for enterochromaffin cell response to mechanical forces. *J Physiol.* 2017; 595:79-91.
- Wang L, Zhou H, Zhang M, Liu W, Deng T, Zhao Q, Li Y, Lei J, Li X, Xiao B. Structure and mechanogating of the mammalian tactile channel PIEZO2. *Nature* 2019; 573: 225-9.
- Woo SH, Lukacs V, de Nooij JC, Zaytseva D, Criddle CR, Francisco A, Jessell TM, Wilkinson KA, Patapoutian. Piezo2 is the principal mechanotransduction channel for proprioception. *Nat Neurosci.* 2015; 18:1756-62.
- Woo SH, Ranade S, Weyer AD, Dubin AE, Baba Y, Qiu Z, Petrus M, Miyamoto T, Reddy S, Lumpkin EA, Stucky CL, Patapoutian A. Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction. *Nature.* 2014; 509:622-6.

- Wu J, Lewis AH, Grandl J. Touch, tension, and transduction – the function and regulation of Piezo ion channels. *Trends Biochem Sci.* 2017; 42: 57-71.
- Yang HM, Kim HJ, Hu KS. Anatomic and histological study of great auricular nerve and its clinical implication. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2015; 68:230-6.
- Yang HM, Won SY, Kim HJ, Hu KS. Sihler staining study of anastomosis between the facial and trigeminal nerves in the ocular area and its clinical implications. *Muscle & Nerve* 2013; 48:545-50.
- Yoshida A, Moritani M, Nagase Y, Bae YC. Projection and synaptic connectivity of trigeminal mesencephalic nucleus neurons controlling jaw reflexes. *J Oral Sci.* 2017 ; 59:177-182.
- Zhao Q, Wu K1, Geng J, Chi S, Wang Y, Zhi P, Zhang M, Xiao B. Ion permeation and mechanotransduction mechanisms of mechanosensitive piezo channels. *Neuron.* 2016; 89:1248-63.
- Zhao Q, Zhou H, Chi S, Wang Y, Wang J, Geng J, Wu K, Liu W, Zhang T, Dong MQ, Wang J, Li X, Xiao B. Structure and mechanogating mechanism of the Piezo1 channel. *Nature* 2018; 554: 487-92.

Webgrafía

Fuente de la figura 2.1 A:

<http://drknight-kinesiology.blogspot.com/2012/09/neural-control-of-movement-part-ii.html>

Fuente de la figura 2.1 B:

https://www.google.com/search?biw=1920&bih=940&tbm=isch&sa=1&ei=fN8NXrnqLYmKlwSzl6WQDg&q=muscle+spinde+and+tendon+organ+&oq=muscle+spinde+and+tendon+organ+&gs_l=img.3...226229.236672..236999...1.0..1.209.2330.31j1j1.....0....1..gws-wiz-img.....0i19j0i67j0i10j0i30j0i10i24.bVscvg3cqDY&ved=0ahUKEwi5mJX78uTmAhUJxYUKHbNLCeIQ4dUDCAY&uact=5#imgdii=fHKMPk_76bJXBM:&imgrc=NrGIP3ZIEtTbEM:&spf=1577967720804

Anexo 1. Curriculum vitae

CURRICULUM VITAE

1. DATOS PERSONALES

Apellidos y Nombre: JUNQUERA OLAY, SONSOLES

Número del D.N.I.: 71650471C Lugar de expedición: Oviedo

Nacimiento.

Lugar: Oviedo

Fecha: 8 de abril de 1992

Domicilio: C/ Santa Susana no 3, 2º A, 33006, Oviedo Teléfono:
646151682

Correo electrónico. Junqueraolays@gmail.com

2. TITULOS ACADÉMICOS

GRADO EN MEDICINA Y CIRUGÍA

2010-2016 **Grado en Medicina y Cirugía**
Facultad de Medicina y Cirugía
Universidad de Santiago de Compostela

3. PUESTOS Y ACTIVIDAD DOCENTE

Colaboradora de la Academia Curso MIR-Asturias ejerciendo funciones de tutor de los alumnos del curso (septiembre 2017-junio 2019).

4. ACTIVIDAD INVESTIGADORA

Trabajo Fin de Grado: *Bases Moleculares del Tacto: detección de Piezo 2 en los corpúsculos sensitivos cutáneos y ganglios raquídeos.*
Universidad de Santiago de Compostela, Junio de 2016. Director: Prof. J. Suárez Quintanilla

5. PUBLICACIONES

Capítulo de libro

Juan L. Cobo, Antonio Solé-Magdalena, **Sonsoles Junquera**, Teresa Cobo, José Antonio Vega and Juan Cobo. The proprioception in the muscle territory of the facial nerve (Chapter 2). Isam Al-Zwaini, Mohammed Jalal Hussein. Selected Topics in Facial Nerve Disorders United Kingdom: MIntechOpen; 2019. p.104-120

DOI: 10.5772/intechopen.84463

Artículos

Junquera S, Álvarez-Yagüe E, Junquera L, Ugalde R, Rúa L. Multiple myeloma and chemical maxillary osteonecrosis. Can both occur simultaneously? J Stomatol Oral Maxillofac Surg. 2019 Dec 18. pii: S2468-7855(19)30288-5.

Junquera S, Escobedo MF, Olay S, Junquera L. Regional migratory osteoporosis in oral and maxillofacial surgeons. Br J Oral Maxillofac Surg. 2019 Dec;57(10):1168-1170.

Junquera-Olay S, Baleato-González S, García-Figueiras R. Fatal pancreatic inflammation: Extensive emphysematous pancreatitis diagnosed by computed tomography. Rev Gastroenterol Mex. 2019; 8: S0375-0906. PMID: 30635135

Muriel JD, Escobedo M, Cobo T, Cobo JL, Olay S, **Junquera S**. Cone Beam Computed Tomography for Detection of Intranasal Foreign Bodies. J Dent Maxillofacial Res. 2019; 2(4):1-3

Escobedo MF, Cobo JL, **Junquera S**, Milla J, Olay S, Junquera LM. Medication-related osteonecrosis of the jaw. Implant presence-triggered osteonecrosis: Case series and literature review. J Stomatol Oral Maxillofac Surg. 2019 Apr 26. pii: S2468-7855(19)30123-5

Megías Barrera J, García-Consuegra L, Novoa A, Costilla S, **Junquera S**, Ascani G. Histological and radiological evaluation of subcutaneous implants in mouse of a 3D-printable material (Fulcure 720) and experimental application in mandibular reconstruction. J Stomatol Oral Maxillofac Surg. 2018;119:88-92.

Escobedo M, García-Consuegra L, **Junquera S**, Olay S, Ascani G, Junquera L. Medication-related osteonecrosis of the jaw: A survey of knowledge, attitudes, and practices among dentists in the principality of Asturias (Spain). J Stomatol Oral Maxillofac Surg. 2018; 119:395-400.

Pelaz A, Junquera L, Gallego L, García-Consuegra L, **Junquera S**, Gómez C. Alternative treatments for oral bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a pilot study comparing fibrin rich in growth factors and teriparatide. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2014 1;19(4):e320-6.

6. COMUNICACIONES A CONGRESOS

Comunicación tipo poster en el II Congreso Iberoamericano de intervencionismo e imagen diagnóstica. Sant Esteve Sesrovires "La

angio-TC en el diagnóstico instrumental de muerte encefálica". Barcelona. 07 de Octubre 2017.

Comunicación oral en el 6º congreso de la SECOMNOR, "Diferencias en los conocimientos y habilidades sobre la osteonecrosis química de los maxilares entre los dentistas con actividad pública o privada en el principado de Asturias". Oviedo. 24-25/11/ 2017

Comunicación tipo poster en el 6º congreso de la SECOMNOR, "El PET-TC en el diagnóstico de las osteonecrosis de los maxilares por medicamentos" Oviedo. 24-25/11/ 2017.

Comunicación formato poster en el XVII Congreso de Cirugía Oral e Implantología. "El valor radiográfico del reborde alveolar festoneado en el diagnóstico de las lesiones de los maxilares". Ibiza. 17-18 de Mayo 2018.

Comunicación formato poster en el XXXIV Congreso nacional Sociedad Española de Radiología Médica (SERAM). "Ecografía escrotal: Patología intra y extratesticular: Guía de supervivencia para residentes". Pamplona. 24-27 de Mayo 2018.

Comunicación formato poster en el *European Society of Radiology* (ECR) "Can imaging studies predict the evolution of medication related osteonecrosis of the jaw?" Viena. 11-15 de Marzo 2019.

Comunicación oral en el *European Society of Radiology* (ECR) "Radiological evaluation of subcutaneous implants in rats, using 3d-printable material photopolymer and its experimental application in bone regeneration" Viena. 11-15 de Marzo 2019.

Comunicación formato poster en el XIII Congreso Gallego de radiología. "Encefalocele adquirido: ¿una causa infradiagnosticada de epilepsia?". Vigo. 10-11 de Mayo 2019.

Comunicación formato poster en el XIII Congreso Gallego de radiología. "Evaluación ecográfica de la vesícula biliar: Guía práctica para residentes". Vigo. 10-11 de Mayo 2019.

Comunicación formato poster en el XIII Congreso Gallego de radiología. "Enterocolitis necrotizante: Guía de supervivencia para residentes". Vigo. 10-11 de Mayo 2019.

Comunicación formato poster en el XIII Congreso Gallego de radiología. "Valor del CBCT en la identificación de los cuerpos extraños nasales". Vigo. 10-11 de Mayo 2019.

7. CURSOS IMPARTIDOS

8. FORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Curso de "Manejo de datos con el Sistema Estadístico SPSS 2014", con una duración de 24 h. Diciembre 2017. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS).

"Jornadas radiológicas" con una duración de 16 h. Enero 2018. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS).

"Máster Proradio". Curso online de programa oficial de actualización profesional en radiología de la Sociedad Española de Radiología Médica (SERAM). 375h (Duración 4 años: 2018-2022). **En desarrollo.**

1º Curso "Experto pro-radio1 en la actualización profesional en radiología" (Curso 2018-2019). Finalizado. (15 ETCS).

"XXX Curso Internacional de Correlación Radio-Patológica". Madrid, 17-20/07/2019.

"A oportunidade da medicina personalizada a través de la impresión 3D". Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS). 20/05/2019.

Estancia formativa en el Servicio de Radiología del Hospital Universitario Central de Asturias (Sección: Cabeza y Cuello). Septiembre y octubre de 2019.

Estancia de investigación en el Laboratorio del Departamento Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, con una duración de 126 h (Curso académico 2017-2018).

9. ACTIVIDAD PROFESIONAL

Médico-Residente de Radiología. Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. Fecha de inicio del contrato. Fecha de inicio: Mayo 2017.

10. OTROS MÉRITOS

Premio a la mejor comunicación formato poster titulada "Encefalocele adquirido: una causa infradiagnosticada de epilepsia". Vigo 10-11 de mayo 2019.

Idiomas

IDIOMA	LEE	HABLA	ESCRIBE
Castellano	C	C	C
Inglés	C	C	C
Portugués	C	M	M
Gallego	C	C	M

C: correctamente / M: nivel medio / NB: nociones básicas

En Oviedo a 18 de diciembre 2019

Fdo: Sonsoles Junquera Olay

Anexo 2. Trabajo derivado de la tesis