



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

PROGRAMA DE DOCTORADO

CIENCIAS DE LA SALUD

Departamento de Cirugía y Especialidades
Médico-Quirúrgicas

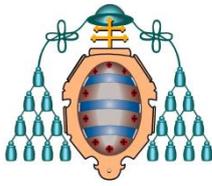
NEUROANATOMIA DE LA CARA

**Anatomía topográfica, quirúrgica,
radiológica y microscópica de la
inervación de la cara**

TESIS DOCTORAL

Juan Luis Cobo Díaz

Oviedo 2016



ASTURIAS
CAMPUS DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**PROGRAMA DE DOCTORADO
CIENCIAS DE LA SALUD**

Departamento Cirugía y Especialidades Médico-
Quirúrgicas

Tesis Doctoral

NEUROANATOMIA DE LA CARA

**Anatomía topográfica, quirúrgica, radiológica y microscópica de
la inervación de la cara**

Juan Luis Cobo Díaz

Oviedo 2016

UNIVERSIDAD DE OVIEDO
PROGRAMA DE DOCTORADO
MORFOLOGÍA Y BIOLOGÍA CELULAR

Tesis Doctoral

Departamento Cirugía y Especialidades
Médico-Quirúrgicas

NEUROANATOMIA DE LA CARA

**Anatomía topográfica, quirúrgica, radiológica y microscópica de
la inervación de la cara**

Juan Luis Cobo Díaz

Directores

Prof. José A. Vega Álvarez – Prof. Juan Carlos de Vicente Rodríguez

Oviedo 2016



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
NEUROANATOMIA DE LA CARA. Anatomía topográfica, quirúrgica, radiológica y microscópica de la innervación de la cara	NEUROANATOMY OF THE FACE. Topographical, surgical, radiological and microscopical anatomy of the face innervation
2.- Autor	
Nombre: JUAN LUIS COBO DIAZ	
Programa de Doctorado: CIENCIAS DE LA SALUD	
Órgano responsable: CENTRO INTERNACIONAL DE POSTGRADP	

RESUMEN (en español)

1.- Objetivos: contribuir al conocimiento de la neuroanatomía de la cara, estudiando las comunicaciones de los nervios facial y trigémino y realizando un mapa topográfico de las ramas de los nervios facial y trigémino respecto al sistema musculo-aponeurótico superficial de la cara. Además, se analizó la innervación propioceptiva de los músculos faciales innervados por los nervios facial y trigémino, así como la implicación del sistema neurotrófico NT-3/TrkC en su desarrollo. También se estudió la innervación sensitiva, especialmente la mecanosensitiva, de la piel de la cara. Finalmente mediante resonancia magnética se estudió la distribución de las ramas de los nervios facial y trigémino en la cara.

2.- Material y técnicas: Para la realización del trabajo se utilizó material humano procedente de cadáveres fijados, cadáveres frescos y piezas quirúrgicas, y material de ratones normales y portadores de una mutación no funcional en el gen que codifica para la neurotrofina-3 (NT-3) y su receptor de alta afinidad TrkC. Además se realizó un estudio de resonancia magnética (RM). Todos los estudios se realizaron de acuerdo con la legislación española y las directrices de la Declaración de Helsinki II. Sobre el material humano se realizaron disecciones detalladas para establecer el tipo de ramificación del nervio facial y las uniones entre las porciones terminales de las ramas de los nervios facial y trigémino. Además se realizaron cortes histológicos de diferentes regiones de la cara que se procesaron para técnicas histológicas estructurales (asociada a un estudio cuantitativo de los diferentes planos histológicos de la cara) y de inmunohistoquímica para la identificación de los nervios. Además, sobre estas mismas secciones se realizó un estudio detallado en los husos neuromusculares y propioceptores faciales utilizando marcadores nerviosos y para posibles mecanoproteínas (ASIC2, TRPV4 y Piezo2). Sobre muestras quirúrgicas de piel de la mejilla se estudio la innervación sensitiva cutánea mediante técnicas de inmunohistoquímica. Y adicionalmente se realizó un estudio de RM para tratar de detectar las ramas periféricas de los nervios facial y trigémino dentro del espesor de las mejillas. Sobre el material de ratón se realizaron estudios estructurales, de inmunohistoquímica para la detección de nervios, y microscopía electrónica centrada en los husos neuromusculares de los animales controles y portadores de la mutación.

3.- Resultados y conclusiones: El patrón de ramificación del nervio facial en las 10 hemicabezas analizadas fue 60% de tipo II, 30% de tipo IV y 10% de tipo V. Por otro lado, se han encontrado en todos los casos (10/10) uniones trigemino-faciales entre los ramos infraorbitario y zigomático, y el marginal mandibular y el mentoniano, pero ninguna otra. En cuanto a la disposición del SMAS en las diferentes regiones faciales analizadas, se pudo identificar en la mejilla y región parotídeo-maseterina, pero no en el resto de las zonas, aunque en alguna de ellas se observaron estructuras equivalentes. Por tanto el SMAS no puede considerarse como una estructura continua sino como propia de algunas de ellas. En



cuanto a la disposición de los nervios respecto a los planos estructurales de la cara, los troncos de mayor calibre se disponen profundos al SMAS pero también se encontraron troncos por encima del SMAS en el tejido fibroadiposo superficial. Se realiza un mapa de la disposición de los troncos por regiones faciales. Por otro lado, el espesor relativo de los planos fue variable en cada una de las regiones. En los músculos craneofaciales inervados por el trigémino se han encontrado husos neuromusculares típicos mientras que en los que están inervados por el facial no existen. Pero se han encontrado estructuras que pueden sustituirlos; son muy variables morfológicamente (clasificados por nosotros como de tipos I, II y III), y expresan inmunorreacción para mecanoproteínas relacionadas con la propiocepción. La densidad de cada uno de estos tipos de estructuras en los diferentes músculos faciales fue variable siendo máxima en los músculos bucinador y orbiculares, y mínima en los zigomáticos. Por otro lado, hemos observado que en el ratón el desarrollo de los husos neuromusculares de los músculos masticadores depende del sistema NT-3/TrkC. Por lo que se refiere a la inervación sensitiva de la piel, sólo se han encontrado formaciones nerviosas corpusculares en la piel de los labios (corpúsculos de Meissner) mientras que en la piel de la mejilla se encuentran células de Merkel con propiedades de mecanorreceptoras. Con el nivel de resolución actual de la RM no es posible identificar con claridad los nervios en el espesor de la pared de las mejillas, pero si los vasos y los planos aponeuróticos que la forman.

RESUMEN (en Inglés)

1.- Objectives: to contribute to the knowledge of the facial neuroanatomy studying the communications of the facial and trigeminal nerves, and making a topographic map of their branches with respect to the facial superficial musculo-aponeurotic system. In addition, the proprioceptive innervation of facial muscles innervated both the facial and trigeminal nerves, was analyzed, as well as the dependence of proprioceptors development on the NT-3/TrkC neurotrophic system. Also the sensory innervation of the facial skin, specially the mechanosensitive one, was investigated. Finally, using magnetic resonance the distribution of the branches of the facial and trigeminal nerve branches was studied.

2.- Material and Methods: Human material obtained from fixed and fresh cadavers and surgical pieces, as well as material from mice normal and carrying a nonfunctional mutation in the gene that codifies for neurotrofina-3 (NT-3) and its high affinity TrkC receptor. In addition a study of magnetic resonance (MR) was made. All these studies were carried out in agreement with the Spanish legislation and the directives of the Declaration of Helsinki II. On the human material detailed dissections were performed to establish the pattern of the facial nerve branching, and the communications between the final portions of the branches of the facial and trigeminal nerves. In addition, sections of different regions from the face were processed for structural histological techniques (associate to a quantitative study of the different structures of the face) and of immunohistochemistry for the identification of the nerves. In addition, on these same sections a detailed study was made in the muscle spindles and facial muscle proprioceptors using specific markers for nerves and putative mechanoproteins (ASIC2, TRPV4 and Piezo2). On surgical cutaneous samples of the cheek the cutaneous sensory innervation by means of immunochemical techniques. And additionally MR study was made to try to detect the peripheral branches of the facial and trigeminal nerves within the thickness of the cheeks. On the mouse material structural, ultrastructural and immunohistochemical studies were made, all focused on muscle spindles of wild type and mutated animals.

4.- Results and Conclusions: The pattern of branching of the facial nerve in the 10 analyzed hemifaces was 60% of type II, 30% of type IV and 10% of type V. On the other hand, trigemino-



facial communications were found between the infraorbital and zygomatic branches and between the marginal mandibular and the mentonian one have been in all the cases (10/10) mandibular and the mentoniana branches, but no other. As far as the arrangement of SMAS in the studied facial regions, it was identified in the cheek and parotid-masseteric regions, but not in the other zones, although in some of them equivalent structures were observed. Therefore the SMAS cannot be considered a continuous structure but like own of some of them. Regarding the disposition of the nerves respect to the structural planes of the face, the trunks of greater diameter are arranged deep to the SMAS but also were nerves over the SMAS in the superficial fibroadipose tissue. A map of the disposition of the nerve profiles in the facial regions was made. On the other hand, the thickness of the facial planes was variable in each one of the regions. In the craneofaciales muscles innervated by the trigeminal nerve typical muscle spindles were observed whereas in which innervated by the facial nerve they do not exist. Nevertheless, structures that can replace muscle spindles were found; they are variable morphologically (classified by us like of types I, II and III), and expresses immunoreactivity for mechanoproteins related to the proprioception. The density of these structures in each facial muscle was variable, being maximal in the buccinator and orbicular muscles and minimal in the zygomatic muscles. On the other hand, we have observed that the development of muscle spindles in murine masticatory muscles depends on NT-3/TrkC system. As for the sensory innervation of the facial skin, differentiated nerve formations were observed in the skin of the lips (Meissner corpuscles) whereas in the skin Merkel cells with mechanorreceptive properties were found. Finally, at the resolution level of the present RM devices it is not possible to clearly identify the nerves in the walls of the cheeks, but blood vessels and planes forming it can be clearly identified.

Índice

1.- Introducción, 13

2.- Estado actual del problema

2.1. Introducción: Anatomía funcional de los músculos faciales

2.1.1 Anatomía macroscópica, 18

2.1.2. Anatomía microscópica, 20

2.1.3. Características histoquímicas, 20

2.2. El sistema músculo-aponeurótico superficial

2.2.1 Anatomía macroscópica, 21

2.2.2. Anatomía microscópica, 26

2.3. Anatomía de superficie de los nervios facial y trigémino, 28

2.4. Comunicaciones trigémino-faciales, 30

2.5. Relaciones de los nervios facial y trigémino con los planos histológicos de la cara, 34

2.6. La inervación propioceptiva de los músculos faciales, 39

2.7. La inervación sensitiva de la piel de la cara, 41

2.8. Bases moleculares de la mecanosensibilidad, 45

3.- Objetivos, 50

4.- Material y Técnicas

4.1. Material

4.1.1. Material humano: obtención y procesado de las piezas, 54

4.1.2. Material de ratón: obtención y procesado de las piezas, 56

4.2. Técnicas

4.2.1. Disección, 57

4.2.2. Técnicas estructurales: Hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson, 57

4.2.3. Técnicas de inmunohistoquímica

4.2.3.1. Inmunoperoxidasa indirecta mediante la técnica de la PAP, 58

4.2.3.2. Doble inmunofluorescencia, 59

4.2.4. Microscopía electrónica, 60

4.2.5. Análisis cuantitativo, 61

4.3. Estudio de resonancia magnética, 61

5.- Resultados

5.1. Anatomía macroscópica del nervio facial

5.1.1. Patrones de ramificación del nervio facial, 63

5.1.2. Comunicaciones trigémino-faciales, 67

5.2. Anatomía topográfica y regional de los nervios de la cara: relaciones con los planos músculo-aponeuróticos faciales

5.2.1. Descripción y espesor relativo de los planos, 68

5.2.2. Identificación microscópica de los nervios en la cara, 143

- 5.2.3. Distribución regional de los nervios de la cara, 150
 - 5.2.3.1.- Mejilla, surco nasolabial y bucal
 - 5.2.3.2.- Región masetérico-partotídea
 - 5.2.3.3.- Región temporal
 - 5.2.3.4.- Mentón
 - 5.2.3.5.- Labio superior
 - 5.2.3.6.- Ceja.
 - 5.2.3.7.- Párpado superior
- 5.3. **Inervación propioceptiva de los músculos faciales**
 - 5.3.1. Presencia de husos neuromusculares en los músculos inervados por el nervio trigémino, 160
 - 5.3.3. Descripción de las formaciones sensitivas de los músculos faciales, 164
 - 5.3.4. Densidad de formaciones sensitivas en los músculos faciales, 169
 - 5.3.5. Presencia de mecanoproteínas en las formaciones sensitivas de los músculos faciales, 170
- 5.4. **El sistema NT-3/TrkC determina la presencia de husos neuromusculares inervados por el trigémino, pero no el facial, 174**
- 5.5. **Inervación sensitiva de la cara**
 - 5.5.1. Formaciones sensitivas de la piel de la cara, 181
 - 5.5.1. Estructuras mecanosensitivas de la piel de la cara, 182
- 5.6. **Estudio de los nervios faciales mediante resonancia magnética, 185**

6.- Discusión

- 6.1. **Consideraciones generales, 192**
- 6.2. **La estructura histológica de la cara: ¿existe realmente un SMAS continuo?, 193**
- 6.3. **Los nervios facial y trigémino tienen ramas superficiales y profundas al SMAS, 195**
- 6.4. **Las comunicaciones trigémino-faciales, 196**
- 6.5. **Alternativas a los husos neuromusculares en los músculos faciales: propioceptores de los músculos faciales, 199**
- 6.6. **El sistema NT-3/TrkC regula el desarrollo de los músculos masticadores, 202**
- 6.7. **Mecanorreceptores en la piel facial: más moleculares que morfológicos, 204**
- 6.8. **Aun no es posible hacer una anatomía por la imagen de los nervios facial y trigémino, 206**
- 6.9. **Limitaciones del estudio, 207**
- 6.10. **Consideraciones prácticas y perspectiva de futuro, 208**

7.- Conclusiones, 211

8.- Bibliografía, 217

1. Introducción

1. Introducción

Los nervios facial y trigémino son los responsables de la inervación motriz y sensitiva, respectivamente, de los músculos faciales y de la piel de la cara. Todos los textos clásicos de Anatomía Humana describen con detalle el origen, trayecto, ramificaciones y variantes anatómicas de ambos pares craneales y da la impresión de que poco nuevo queda por decir de ellos. Sin embargo, nada más lejos de la realidad.

Para comenzar, no están completamente aclaradas las relaciones del nervio facial y de algunas ramas superficiales del trigémino con el conjunto de planos cutáneos y fibroadiposos de la parte central de la región lateral de la cabeza, en especial con el denominado sistema musculo-aponeurótico superficial (SMAS). Se trata de una serie de membranas formadas por zonas de fusión bilaminares situado entre la piel y la fascia profunda, o el periostio, y que define los compartimentos grasos y anatómicos de la cara (Pessa, 2016). La primera parte de esta tesis se centra en el estudio de la anatomía topográfica del SMAS y la disposición de las ramas principales del nervio facial respecto a los planos histológicos de la cara. Se han realizado disecciones minuciosas en cadáveres para seguir el trayecto de las ramas nervio facial y mediante cortes asociados a tinciones estructurales e inmunohistoquímica se determinó la distribución de los nervios. Para confirmar los datos obtenidos de los estudios anatómico e histológico, aprovechando el nivel de resolución que se logra con los nuevos métodos de imagen y siguiendo las directrices básicas marcadas por Borges y Casselman (2010) y Veillona et al. (2010), se realizó un estudio de los nervios de la cara y sus ramas sobre imágenes de resonancia magnética.

La función del nervio trigémino en la cara es principalmente sensitiva, recogiendo la sensibilidad de la piel y mucosas. En una revisión reciente llevada

a cabo por Siemionow et al. (2011) se describe la cara como un órgano sensitivo capaz de recibir información y transmitirla al sistema nervioso central. Para cumplir esta función la piel de la cara está dotada de diferentes morfotipos de corpúsculos sensitivos del tipo de corpúsculos de Meissner y Ruffini, complejos célula de Merkel-axón, formaciones nerviosas asociadas a los folículos pilosos y, por supuesto, terminaciones nerviosas libres. A pesar de todo, el perfil inmunohistoquímico de las formaciones nerviosas sensitivas cutáneas del territorio del trigémino humano aún no se conoce. Un excelente trabajo realizado por Nolano et al. (2013), sobre muestras de biopsias cutáneas, ofrece imágenes extraordinarias del patrón de inervación en algunas zonas de la piel facial, pero no de su totalidad. En nuestro trabajo se han incluido amplios segmentos de piel de las regiones frontal, temporal, mejilla, mentoniana, labio superior y párpado superior. Se ha puesto especial énfasis en detectar posibles variaciones en función de la zona analizada, así como de la edad y del sexo. Y de todos los aspectos relacionados con la sensibilidad de la cara nos hemos centrado en la mecanosensibilidad, explorando la distribución en la piel facial de algunos canales iónicos relacionados con esta modalidad sensorial (del Valle et al., 2012).

Otro aspecto de la inervación facial abordado en el presente trabajo, y sin duda el más controvertido, es el relativo a la inervación sensitiva de los músculos faciales. El aparato locomotor contiene un sistema sensitivo intrínseco, el sistema propioceptivo, que proporciona al sistema nervioso central la información sobre la estática y dinámica de las articulaciones y la tensión de los músculos. Pero si las fibras del nervio facial son motrices ¿cómo se recoge la sensibilidad propioceptiva de los músculos de la cara? Clásicamente se cree que mediante conexiones con el nervio trigémino y otros pares craneales (ver para una revisión Diamond et al., 2011; Hwang et al., 2015). Por ejemplo, entre el facial y el nervio infraorbitario (Hwang et al., 2004; Tansatit et al., 2016) o el

nervio auriculotemporal (Kwak et al., 2004). Aunque la significación funcional de esas anastomosis aun es desconocida, seguramente sirven para el paso de fibras sensitivas, y vegetativas parasimpáticas, del nervio trigémino al nervio facial (Tansatit et al., 2016), ya que según Lazarov (2007) toda la propiocepción cefálica depende del trigémino. En las disecciones realizadas se ha logrado identificar diversas zonas anastomóticas entre los dos sistemas nerviosos principales de la cara.

Los sensores específicos de la propiocepción son los husos neuromusculares y los órganos tendinosos, aunque también pueden actuar como tales algunos morfotipos de mecanorreceptores presentes en las cápsulas articulares (Zimny, 1991). Sin embargo, los músculos craneofaciales, salvo los inervados por el nervio trigémino (Osterlund et al., 2011), carecen de husos neuromusculares (Stål et al., 1987, 1990; Kamen y De Luca, 1992; Goodmurphy y Ovalle, 1999; ver para una revisión De Carlos et al., 2013). Los trabajos en humanos sobre este tema se limitan al trabajo clásico de Kadanoff (1956) que describe la presencia de abundantes de receptores musculares que varían desde husos neuromusculares típicos hasta terminaciones nerviosas libres, especialmente en los músculos periorales. Con posterioridad Nelson y Blaivas (1991) han descrito la presencia de 1 huso neuromuscular en el músculo *orbicularis oculi* en un espécimen pediátrico. En nuestro trabajo se ha realizado una búsqueda de “otros tipos” de posibles propioceptores musculares mediante técnicas de inmunohistoquímica, localizando en ellos proteínas específicas relacionadas con la mecanotransducción (ver De Carlos et al., 2013).

Con estos estudios se pretende contribuir al conocimiento de la neuroanatomía de la cara y establecer conceptos básicos que pueden ser de capital importancia en la práctica de especialidades como la cirugía plástica o la maxilofacial.

2. Estado actual

2. Estado actual del problema

2.1. Introducción: Anatomía funcional de los músculos faciales

2.1. 1. Anatomía macroscópica

Los músculos faciales se consideran normalmente como entidades aisladas, cada uno con su propia identidad y función (D'Andrea y Barbaix, 2006; Stranding, 2008). Sin embargo, este punto de vista ha cambiado y actualmente se tiende a presentarlos como estructuras interdependientes ya que no tienen inserciones óseas bien definidas y carecen de una fascia muscular que los aisle e individualice. Por otro lado, la taxonomía de los músculos faciales es difícil porque existen una gran variedad de nomenclaturas y denominaciones (Diogo et al., 2008, 2009). En el presente estudio se ha utilizado para su denominación la nómina internacional (Dauber, 2007; **Figura 2.1**). En los párrafos que siguen se hace una somera descripción topográfica-funcional de los músculos faciales que puede ayudar a interpretar, comprender y discutir los resultados de este trabajo.



Figura 2.1.- Esquema de la localización y denominación, según la nómina internacional, de los músculos craneofaciales y del cuello. 1: temporalis, 2: frontalis, 3: corrugator supercilii, 4: orbicularis oculi, 5: procerus, 6: nasalis, 7: levator labii superioris alaeque nasi, 8: levator labii superioris, 9: zygomaticus minor, 10: zygomaticus major, 11: orbicularis oris, 12: masseter, 13: buccinator, 14: risorius, 15: modiolus, 16: depressor anguli oris, 17: depressor labii inferioris, 18: mentalis, 19: platysma, 20: sternocleidomastoideus, 21: occipitalis. Tomado de Marur et al. (2014).

La frente y la región de la glabella contienen un grupo de los músculos adaptados a la función de cambiar la morfología de la piel de la región de la ceja. Son los músculos *frontalis* (que carece de inserciones óseas), *corrugator supercillii*, *depressor supercillii* y *procerus* (Knize, 2000).

El músculo *orbicularis oculi* es el responsable del cierre de los párpados; se inserta en las paredes de la órbita y en él se diferencian tres porciones concéntricas: la interna pretarsal, la intermedia preseptal y la externa orbitaria (McLoon y Wirtschafter, 1991).

La región de la nariz contiene un sistema de músculos que produce cuatro movimientos principales: elevación por acción del *procerus*; constricción de los orificios nasales por el músculo *nasalis*; dilatación de los orificios nasales por el *levator labii superioris alaquae nasi*; y descenso del septo nasal por el *depressor septi nasi* (Hur et al., 2011).

La zona perioral queda delimitada entre el arco zigomático y el borde inferior de la mandíbula, y su anatomía es compleja y muy variable. Normalmente se admite que en ella existen una capa muscular superficial y otra profunda, separadas por un plano que contiene las ramas del nervio facial. En la capa profunda se sitúan el *orbicularis oris* y el *buccinator*, que constituyen la base de las mejillas y pueden ser considerados como una unidad anatómica bilateral. Actúan presionando la mejilla contra los dientes, proporcionando así contención activa de la cavidad bucal (D'Andrea and Barbaix, 2006). Los músculos periorales superficiales tienen exclusivamente función mimética y muestran una alta variabilidad interindividual y realizan movimientos centrípetos y centrífugos, antagónicos, que determinan la apertura y cierre de la boca. Son los músculos *orbicularis oris*, *mentalis*, *risorius*, *zygomaticus major* y *minor*, *levator labii superioris*, *levator labii superioris alaquae nasi*, *depressor anguli oris* y *depressor*

labii inferioris (Pessa et al., 1998; Shim et al., 2008; Hur et al., 2010; Youn et al., 2012).

Todos los músculos faciales, a excepción del *frontalis* y el *orbicularis oris*, tienen una inserción directa en el periostio de los huesos de la cabeza y otra en la piel de la cara que es, en última instancia, el efector sobre el que actúan. La piel facial, por su parte, también tiene algunos puntos de adherencia perióstica (Mendelson et al., 2002; Muzaffar et al., 2002).

2.1.2. Anatomía microscópica

Los músculos faciales ofrecen notables diferencias estructurales con el resto de los músculos del cuerpo. La más importante está en relación con los tejidos conectivos ya que carecen de fascia muscular o epimisio y la cantidad de tejido conectivo intrínseco, perimisio, es mayor que en el resto de los músculos (Nelson and Blaivas, 1991). No obstante, ni la longitud ni el calibre de las fibras musculares ofrecen datos de interés, y en cualquier caso existe siempre una gran variabilidad inter e intraindividual (Nelson and Blaivas, 1991; Stål et al., 1994; Goodmurphy and Ovalle, 1999; Ito et al., 2006; Cheng et al., 2007).

2.1.3. Características histoquímicas

Los músculos esqueléticos contienen diferentes clases de fibras, clasificadas en base a su reacción para la ATPasa miofibrilar a diferentes pH, en tipo I, tipo IIA y tipo IIB en (Scott et al., 2001). La tipificación fibrilar de cada músculo es indicativa de sus propiedades fisiológicas, especialmente de la velocidad de contracción, tensión máxima y susceptibilidad a la fatiga. Los músculos en los que predominan las fibras de tipo I (contracción lenta, resistentes a la fatiga) suelen estar implicados en movimientos posturales y prolongados. Por el

contrario, la prevalencia de fibras de tipo II (contracción rápida) indica contracciones musculares rápidas, fásicas (Pette y Staron, 2001). En este contexto los músculos faciales forman una población considerablemente heterogénea, aunque existen propiedades especiales en algunos de ellos (Happak et al., 1988; Freilinge et al., 1990; Nelson and Blaivas, 1991; Goodmurphy and Ovalle, 1999; Cheng et al., 2007).

2.2. El sistema musculo-aponeurótico superficial

2.2.1. Anatomía macroscópica

A diferencia de lo que sucede en el resto del cuerpo, donde el tejido subcutáneo y la *fascia superficialis* están separados de los músculos y se adaptan ligeramente durante la contracción, en la cara existe un complejo mecanismo de conexión entre los músculos de la mímica y la piel (ver Ghassemi et al., 2003; Ferreira et al., 2006).

El sistema músculo-aponeurótico superficial (SMAS) es una capa fibromuscular que conecta y envuelve los músculos de la expresión facial. El término SMAS de la cara se utiliza regularmente tanto en anatomía como en cirugía, a pesar de que no existe en la nomenclatura anatómica una referencia exacta para el mismo (Ferreira et al., 2011). Fue descrito originalmente por Mitz y Peyronie (1976) y su manipulación quirúrgica (disección, movilización, tracción) es habitual en muchas intervenciones de cirugía estética y otras especialidades quirúrgicas de la cabeza y el cuello (Jowett y Mlynarek, 2010; Ramanadham y Rohrich, 2015; **Figuras 2.2 y 2.3**).

Con carácter general puede decirse que el SMAS está localizado entre la dermis y los músculos faciales y divide la grasa hipodérmica en dos estratos: el superficial al SMAS formado por lóbulos pequeños separados por septos

conectivos, y el profundo dispuesto por debajo del SMAS en el que los lóbulos grasos son de mayor tamaño y los tabiques menos diferenciados.

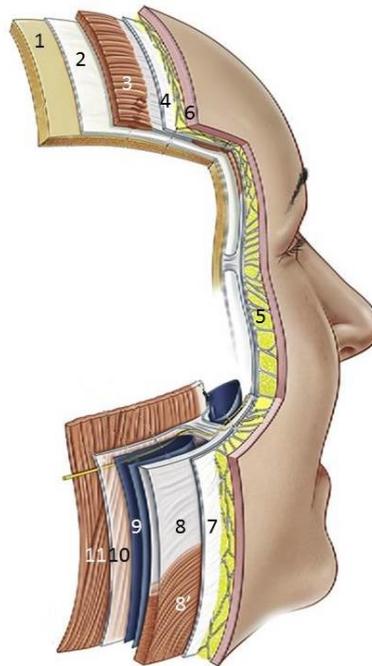


Figura 2.2.- Esquema de los diferentes planos de la cara, que son simples a nivel de la bóveda craneal y más complejos en la mejilla. 1: hueso, 2-10: periostio y fascia profunda, 3-4 y 7-8-8': plano músculo aponeurótico, 5: espacio celular subcutáneo, 6: piel, 9: espacios y ligamentos de retención, 11: músculos profundos (bucal). Tomada de Mendelson y Jacobson (2008).

Los manuales de anatomía describen el SMAS como un plano único en la cara, no adherido directamente al hueso, compuesto de fibras musculares en algunas áreas, y por tejido fibroso o fibroaponeurótico en otras (Standring, 2008). En cirugía plástica, sin embargo, se admite la existencia de dos planos diferentes: uno subcutáneo y otro sub-SMAS (Rees y Aston, 1977; Owsley, 1983).

En la literatura científica hay dos corrientes de opinión acerca del SMAS. La descripción original proponía una división topográfica en dos porciones: una fina por delante del trago sobre la región parotídea y otra más gruesa en la región anterior de la mejilla (Mitz y Peyronie, 1976). Por su lado, Jost y Levet (1984) afirmaron que el SMAS está formado por una lámina externa (hoja) de la cápsula de la parótida que es imposible de separar de la fascia parotídea. Pero a

pesar de todas las evidencias no faltan autores que todavía no admiten la existencia del SMAS como una entidad anatómica autónoma, o admiten su existencia en otras regiones faciales aparte de la parotídea (McKinney y Gottlieb, 1985; Gardetto et al., 2002). La ausencia de criterios a la hora de identificar, clasificar y dividir el SMAS es, sin duda, consecuencia de la falta de un estudio anatómico detallado y sistemático de las fascias de la totalidad de la cara en términos de estructura, topografía, límites y conexiones con los músculos y la piel. Sólo en los últimos años diferentes grupos de trabajo han analizado en detalle la anatomía del SMAS, pero aún no se han investigado en detalle sus relaciones con los nervios.

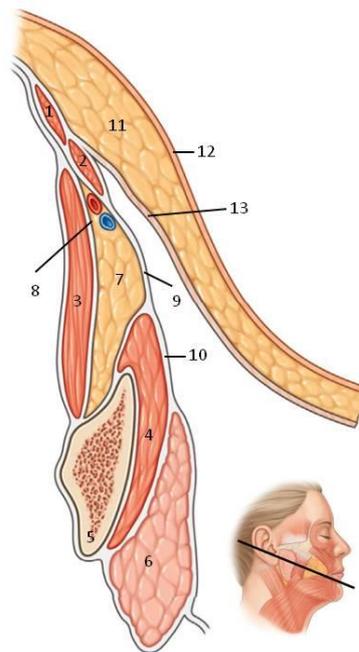


Figura 2.3.- Esquema de las relaciones del SMAS con las estructuras más profundas: fascia bucal y fascia maseterina. 1: músculo zigomático mayor, 2: músculo zigomático menor, 3: músculo bucal, 4: músculo masetero, 5: mandíbula, 6: glándula parótida, 7: grasa bucal (profunda), 8: vasos faciales, 9: fascia bucal, 10: fascia maseterina, 11: grasa subcutánea (superficial), 12: piel, 13: SMAS. Modificada de Kahn y Bagueri (2014).

El SMAS tiene diferentes regiones, que se diferencian principalmente en el espesor. La **primera zona** está limitada por el zigoma y el reborde orbitario

superior y termina en la protuberancia occipital. En esta región el SMAS envuelve al músculo fronto-occipital. Está adherido a la galea y a la fascia temporal superficial. La **segunda zona** se extiende desde el cuello hasta el surco y pliegue nasofaciales y el cartílago auricular. En la parte preauricular de la mejilla, debajo del zigoma, el SMAS es una capa gruesa y fibrosa dispuesta bajo la grasa subcutánea. En la parte lateral de la mejilla está muy adherido a la fascia parotídea. Y en el surco nasofacial y reborde infraorbital se adelgaza. En el borde infraorbitario se fija al músculo zigomático mayor mediante el ligamento zigomático. La **tercera zona** incluye el surco nasofacial, la nariz, el pliegue nasolabial, la zona perioral y los labios; en ella la fascia superficial, pero es mucho más delgada y menos diferenciable, y posee poca grasa subcutánea.

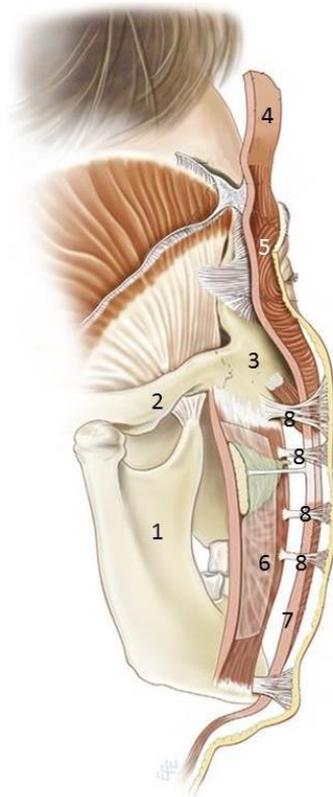


Figura 2.4.- Esquema de las relaciones de la fascia profunda con los planos superficiales de la cara. 1: maxilar inferior, 2: apófisis zigomática del temporal, 3: malar, 4: músculo fronto-occipital; 5: músculo orbicularis oculi, 6: fascia profunda, 7: músculos superficiales, 8: ligamentos de retención zigomáticos y maseterinos. Tomado de Tomado de Kahn y Bagheri (2014).

Dentro del conjunto del SMAS existen fuertes **ligamentos de retención**, denominados osteocutáneos y fasciocutáneos, que conectan la piel al hueso y los diferentes planos del SMAS entre sí (Rossel-Perry y Paredes-Leando, 2013); y otros que unen al SMAS con la fascia profunda de manera discontinua (Furnas, 1989; Stuzin et al., 1992; Mendelson, 2001; Alghoul y Codner, 2013; Alghoul et al., 2013; **Figura 2.4**). Entre dichos ligamentos hay amplias áreas no adheridas (*glide planes*) que favorecen la movilización facial (**Figura 2.5**; Mendelson et al., 2002; Gassner et al., 2008).

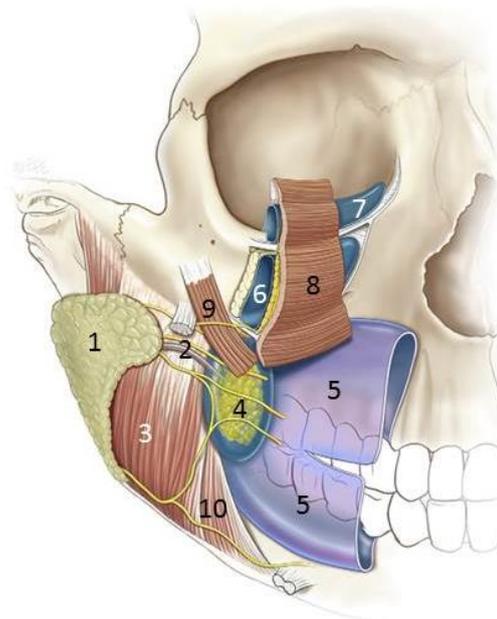


Figura 2.5.- Esquema de la anatomía espacial de la región de la mejilla ilustrando la localización de los espacios preseptal, prezigomático, masticador y cavidad oral. El ligamento retenedor orbicular separa el espacio preseptal del espacio prezigomático. Los ligamentos zigomático-cutáneos separan el espacio prezigomático del espacio masticador. 1: glándula parótida, 2: conducto parotídeo, 3: músculo masetero, 4: paquete adiposo de Bichat, 5: espacio masticador; 6: espacio prezigomático, 7: espacio preseptal, 8: músculo orbicular de los párpados, 9: músculo zigomático menor. Tomada de Mendelson y Jacobson (2008).

Las uniones o ligamentos fasciocutáneos provienen de la dermis y se unen al SMAS subyacente; son numerosas y fuertes en las áreas de la frente, los ojos, la nariz, los labios y el mentón; son menos resistentes en las áreas laterales de las mejillas y laxas en mejillas y sienes. Los ligamentos osteocutáneos, por su lado,

se extienden entre el periostio y la piel suprayacente. El ligamento zigomático (zigomaticocutáneo o parche de McGregor) tiene su origen en el hueso zigomático y se inserta en la dermis, el borde inferior del orbicular y la grasa ocular. El ligamento mandibular o mandibulocutáneo une la mandíbula al platisma y al depresor de ángulo de la boca.

Durante la última década se han realizado una serie de estudios, tanto macroscópicos como microscópicos, que han demostrado la existencia del SAMS y su estructura, y han propuesto un papel funcional para la misma (Pensler et al., 1985; Thaller et al., 1990; Har-Shai et al., 1997; Gardetto et al., 2002; Ghassemi et al., 2003; Huggins et al., 2007). Sin embargo, los trabajos sobre secciones histológicas completas son muy escasos (Barton, 1992; Gosain et al., 1993), y hasta donde nosotros conocemos no hay estudios detallados sobre las relaciones de las ramas de los nervios facial y trigémino con el SMAS.

2.2.2. Anatomía microscópica

Entre todos estos trabajos sobresalen los de Macchi et al. (2007a,b, 2010) realizados sobre de 8 cadáveres (edades entre 60 y 92 años) durante un curso de rejuvenecimiento facial organizado por la Universidad de Padova. En una hemacara se hizo disección macroscópica y en la otra se estudió su estructura. Además, en los cortes histológicos se realizaron técnicas de inmunohistoquímica (detección de la proteína S100) para determinar la presencia de nervios. En nuestro trabajo hemos seguido fielmente la nomenclatura utilizada por estos autores, tanto desde la perspectiva macroscópica como microscópica.

El riguroso análisis de estos autores permitió demostrar que el SMAS es un *continuum* desde la región parotídea hasta el surco nasolabial; además demostraron que en toda la cabeza existe una estratigráfica del tejido subcutáneo que, de superficie a profundidad, es la siguiente: epidermis, corion, capa de tejido conectivo fibroadiposo superficial con el *retinaculum cutis*

superficialis, capa laminar de tejido conectivo (fascia superficial o SMAS), capa de tejido conectivo fibroadiposo profundo con el *retinaculum cutis profundum* y la fascia profunda (muscular).

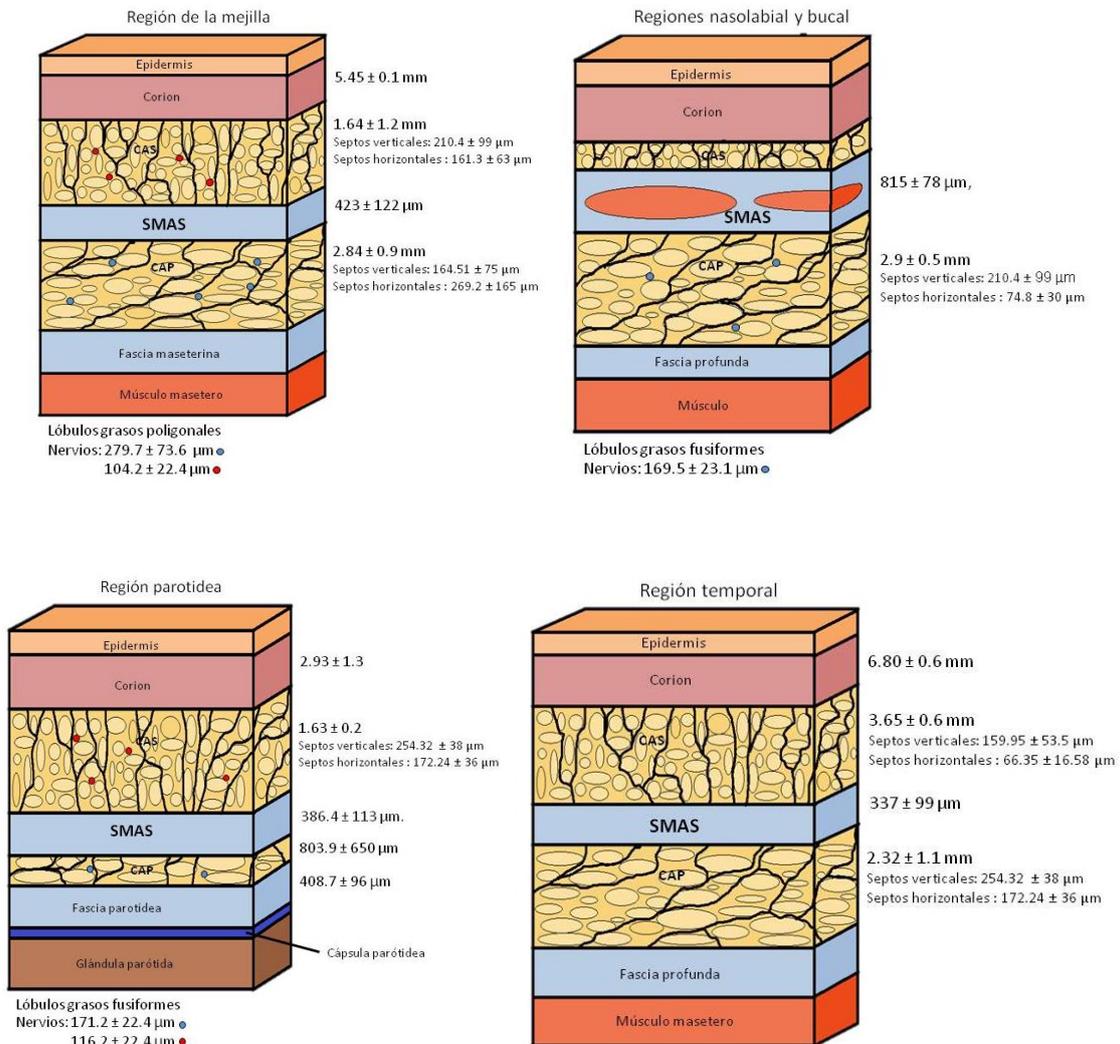


Figura 2.6.- Variaciones regionales en el espesor relativo del tejido subcutáneo. Esquema elaborado a partir de los datos del estudio de Macchi et al. (2010)

La organización básica del SMAS muestra una complejidad progresiva desde la región preauricular al surco nasolabial, así como variaciones regionales en el espesor de los tejidos conectivos fibroadiposos superficial y profundo. De hecho, en la región parotídea, el SMAS está fuertemente unido a la fascia parotídea mientras que en el surco nasolabial y las regiones bucales el SMAS se

desdobla para envolver a los músculos orbiculares y zigomáticos. Por otro lado, el tejido fibroadiposo profundo de la cara presenta organización morfofuncional de acuerdo con el tipo de músculos adyacentes; la capa superficial está virtualmente ausente en el surco naso-labial, y la piel está estrechamente unida a los músculos de la mímica, mientras que la capa profunda no existe por completo y es SMAS se adhiere a la fascia en la región parotídea. Las variaciones relativas en el grosor de cada uno de estos estratos así como la presencia de elementos anatómicos destacables se recogen en la **figura 2.6**.

Un estudio posterior de Broughton y Fyfe (2013) sobre un único cadáver de un sujeto de 85 no aporta datos de interés respecto al estudio de Macchi et al. (2010), salvo que el grosor del SMAS en la región parotídea es ligeramente mayor en la parte inferior ($0.419 \pm 0.065 \mu\text{m}$) que en la superior ($0.455 \pm 0.097 \mu\text{m}$).

2.3. Anatomía superficial del los nervios facial y trigémino

Los nervios trigémino y facial son nervios mixtos que llevan fibras motrices y sensitivas responsables de la inervación motriz y sensitiva de la cara, respectivamente; además algunas ramas del nervio trigémino contienen fibras postganglionares parasimpáticas (Monhouse, 2005; Wilson-Pawels et al., 2013; Joo et al., 2014).

La anatomía descriptiva de los nervios trigémino y facial se detalla en todos los textos de anatomía; para la finalidad del presente trabajo se realizará exclusivamente una mención de las ramas cutáneas del nervio trigémino y algunas consideraciones sobre las ramas terminales del nervio facial.

Las **ramas del nervio trigémino** que tienen un trayecto subcutáneo son: los nervios *supraorbitalis* y *supratrochlearis* originados de la porción frontal del

nervio oftálmico; las ramas palpebrales del nervio *lacrimalis*, los nervios *nasales laterales* y el nervio *ethmoidalis anterior*, originados del nervio nasociliar del oftálmico; y el nervio *infratrochlearis* procedente de la misma división principal del trigémino. De la división maxilar del trigémino proceden el nervio *infraorbitalis* y el nervio *zygomaticotemporalis*. De la rama mandibular emergen los nervios *auriculotemporalis*, *buccalis*, *alveolaris inferior* y *mentalis*. Todas estas ramas, como ya se comentó anteriormente están contenidas en las diferentes capas del tejido subcutáneo facial (**Figura 2.7**).

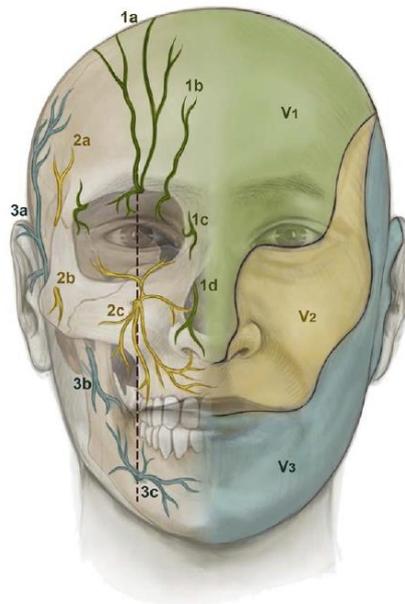


Figura 2.7.- Esquema de la inervación cutánea de la cara. Nervio oftálmico (V1), (1a) nervio supraorbitario, (1b) nervio supratroclear, (1c) nervio infratroclear, (1d) nervio nasal externo; Nervio maxilar (V2), (2a) nervio zigomáticotemporal, (2b) nervio zigomátigofacial, (2c) nervio infraorbitario; Nervio mandibular (V3), (3a) nervio auriculotemporal, (3b) nervio buccal, (3c) nervio mentoniano. Tomado de Marur et al. (2014)

Por lo que se refiere al **nervio facial**, todas sus ramas terminales deben de ser consideradas como superficiales. El nervio facial emerge del interior del *canalis facialis* por el agujero estilomastoideo y se introduce en el interior de la glándula parótida donde habitualmente se bifurca en dos grandes troncos, temporofacial y cervicofacial, que posteriormente darán origen a las 5 principales ramas de división, los nervios *temporales*, *zygomatici*, *buccales*,

marginalis mandibularis y *cervicales*. No obstante, existen numerosas variaciones a este patrón ideal de división y las posibilidades de ramificación del nervio facial son muy numerosas (Moore y Dalley, 1999; Vacher et al., 2015; **Figura 2.8**).

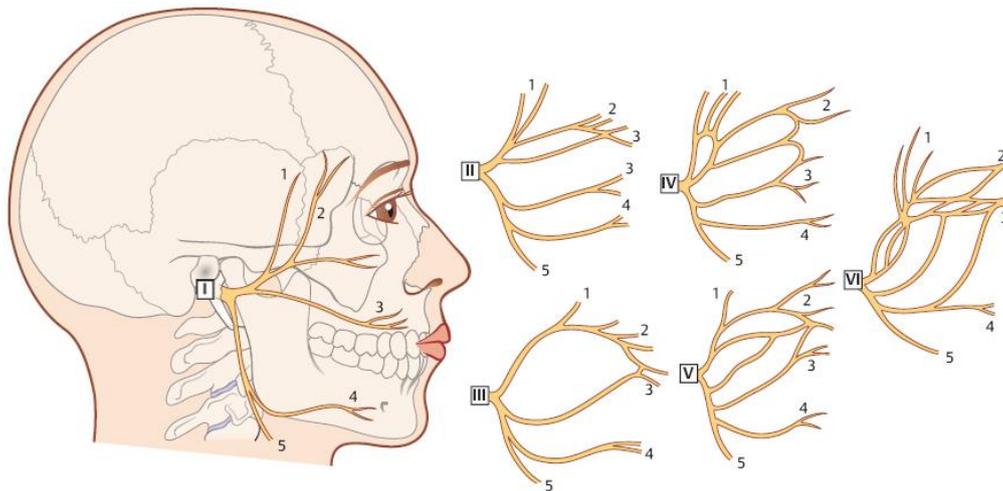


Figura 2.8.- Esquema de los diferentes patrones de ramificación del nervio facial. Modificado y redibujado a partir de Davis et al. (1956).

2.4. Comunicaciones trigémino-faciales

El nervio facial se une con diferentes pares craneales, especialmente el nervio trigémino (Li et al., 2009; Diamond et al., 2011; Shoja et al., 2014). A lo largo de su trayecto el nervio facial tiene numerosas conexiones con ramos motores, sensitivos y vegetativos de varios pares craneales y algunos nervios espinales. La mayoría de estas comunicaciones tienen escaso interés funcional y clínico pero las que se producen a nivel distal con el nervio trigémino son trascendentales para el control y regulación del movimiento de los músculos faciales como se expondrá más adelante (ver para una revisión Diamond et al., 2011).

Todas las ramas del nervio facial en su trayecto extracraneal entre los músculos faciales reciben numerosos puentes de conexión con ramas del nervio trigémino, cuyas fibras acompañan a las del facial hasta los músculos diana

formando unidades sensorio-motoras. Ello hace que la naturaleza del nervio facial, al menos a nivel distal, sea siempre mixta y no motora. Aunque no existen estudios en humanos, los datos obtenidos a partir de animales de experimentación indican que el intercambio de fibras nerviosas se hace siempre de trigémino a facial y no al contrario (Bowden y Mahran, 1960).

En la especie humana se han descrito, de una forma más o menos constante, cinco sistemas anastomóticos trigémino-faciales (**Figura 2.9**): entre la rama horizontal del supraorbitario y el ramo temporal del facial; entre el nervio aurículo-temporal y el facial a diferentes niveles; entre el nervio infraorbitario y la rama ziomática del facial; entre las ramas del bucales de facial y trigémino (Kwak et al., 2004; Hwang et al., 2005; Hu et al., 2007). El destino final de estas fibras sensitivas, sin embargo, no es conocido y no se sabe si terminan en la piel formando terminaciones nerviosas libres y/o corpúsculos sensitivos, o si forman el sistema sensitivo, propioceptivo, muscular. Clásicamente se les han atribuido funciones de viscerorreceptores, propioceptores y exteroceptores en general.

En el estudio de revisión llevado a cabo por Hwang et al. (2015) se concluye que en los trabajos de disección la rama maxilar del trigémino es la que tiene mayor porcentaje de comunicaciones ($95 \pm 8\%$), seguida por el mandibular ($76.7 \pm 38.5\%$) y el oftálmico ($33.8 \pm 19.5\%$). Pero cuando las comunicaciones trigémino-faciales se estudiaron aplicado la técnica de Sihler se constató que existen uniones entre el facial y las ramas maxilar y mandibular del trigémino en el 100% de los casos, y con el oftálmico en el 85.7% de los casos (Yang et al., 2013).

Entrando un poco más en detalle, el **nervio auriculotemporal** presenta comunicaciones constantes, únicas o múltiples, con el tronco del facial, que se denominan nervios comunicantes auriculotemporales (Namking et al., 1994;

Shimada et al., 1994; Kwak et al., 2004). De acuerdo con Kwak et al. (2004) dichas uniones se producen en el interior de la glándula parótida (93.3% de los casos) y llegan a la división superior (temporofacial) en el borde posterior del masetero. Estas anastomosis parecen estar destinadas a la inervación de los músculos faciales superiores (es decir, *frontalis*, *orbicularis oculi* y *zygomaticus major*; Namking et al., 19994) y presumiblemente están relacionados con su nocicepción.

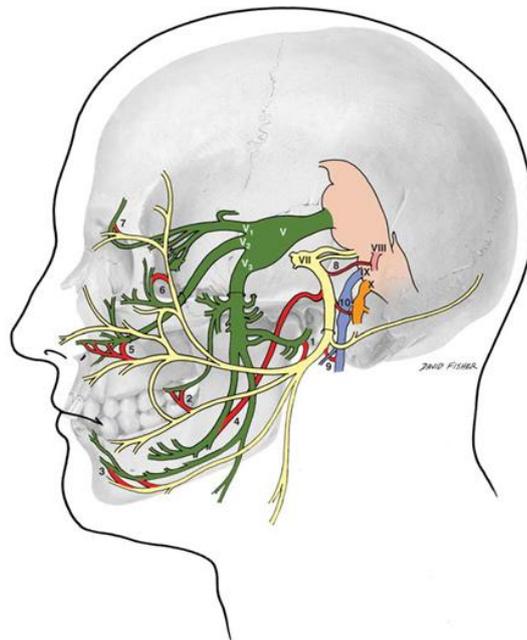


Figura 2.9.- Esquema del nervio facial y sus ramas y conexiones con los nervios trigémino, vestibulococlear, glossofaríngeo y vago. 1: facial-auriculotemporal, 2: facial-lingual, 3: facial-mentoniano, 4: facial-alveolar inferior, 5: facial-infarorbitario, 6: facial-zigomático, 7: facial-oftálmico 8: facial-vestibulococlear, 9: facial-glossofaríngeo, 10: facial-vago. Tomado de Diamond et al. (2011).

Es de destacar que, aunque independiente por completo del trigémino, el facial a este nivel también recibe conexiones del nervio auricular mayor (rama de los nervios espinales cervicales 1 y 2 (Yang et al., 2015).

Por que se refiere a la **rama temporal** del facial, Shimada et al. (1994), y con posterioridad Odorescu et al. (2012), describieron conexiones con el nervio zigomáticotemporal (rama del maxilar) a nivel de la fascia temporal superficial.

Además, tiene conexiones con la rama horizontal del nervio supraorbitario y el nervio auriculotemporal (Hwang et al., 2005; Li et al., 2009; Yang et al., 2013).

La **rama zigomática** del facial recibe conexiones del nervio bucal, rama del mandibular del trigémino, y del zigomáticofacial, rama del maxilar (Tohma et al., 1991; Shimoda et al., 1994). Estas conexiones pueden estar relacionadas con el intercambio de fibras sensitivas y de las fibras parasimpáticas postganglionares destinadas al nervio lagrimal (Bernstein y Nelson, 1984). Además, se han demostrado conexiones entre el nervio zigomático del facial con el auriculotemporal, supraorbitario, bucinador y supratrocLEAR (May, 2000; Yang et al., 2013).

Las **ramas bucales** de los nervios trigémino y facial se anastomosan entre ellas por medio de una rama, conocida como nervio comunicante bucal (Bernstein y Nelson, 1984), en la capa externa de la fascia profunda de la porción anterior del músculo bucinador (Tohma et al., 2004) o dentro de los músculos bucinador y *orbicularis oris* (Shimada et al., 1994). Además, el ramo bucal del nervio facial se une con los nervios infraorbitario, bucinador y auriculotemporal (Yang et al., 2013), el infratrocLEAR, infraorbitario y zigomáticofacial (85.7%, 28.6% y 41.7% de los casos, respectivamente; Yang et al., 2013) y con el nervio mentoniano (Shimada et al., 1994; Hwang et al., 2007b). Un estudio reciente llevado a cabo por Tansatit et al. (2016) identificó comunicaciones triples (25%), dobles (62.5%) o únicas (10%) entre la rama bucal del nervio facial y el nervio infraorbitario (rama terminal del maxilar del trigémino). El tipo más común de comunicación se encontró entre el tronco inferior del nervio bucal y la rama lateral labial de del nervio infraorbitario (70%) en profundidad respecto al *levator labii superioris*. En la serie de Yang et al. (2013) las comunicaciones entre estos nervios llegaba al 100%.

También la **rama mandibular** del facial presenta uniones con el trigémino, que en el caso de los nervios marginal mandibular y el mentoniano llegan al 100% de los casos (Shimada et al., 1994; May, 2000; Hwang et al., 2007a; Yan et al., 2013). Además se une al nervio bucinador (Yang et al., 2013).

Finalmente, las **ramas cervical y marginal mandibular** se anastomosan entre ellas con una frecuencia del $24.7 \pm 1.7\%$ (Hwang et al., 2015).

Pero la contribución del trigémino a la propiocepción facial está en entredicho porque en los estudios de transporte retrogrado desde músculos faciales no se produce marcaje en el núcleo mesencefálico del trigémino (Gong et al., 2003; Horta-Junior et al., 2004), que es el centro en el que se localizan los somas de las neuronas propioceptivas de los músculos masticadores. Pero, obviamente, se trata de resultados en animales de experimentación que no necesariamente pueden ser extrapolados a humanos.

2.5. Relaciones de los nervios facial y trigémino con los planos histológicos de la cara

Las relaciones de los vasos y los nervios con las diferentes capas musculo-aponeuróticas de la cabeza varían de acuerdo con las regiones, pero se acepta con carácter general que las ramas del nervio facial se sitúan profundas respecto al SMAS (**Figura 2.10**). Conocer el trayecto del nervio facial y sus ramas es crucial para realizar cirugía segura, y esta se basa en los planos faciales (Mendelson y Jacobson, 2008).

En la parte superior de la cara el plano situado por debajo del SMAS y encima del periostio es avascular. En la región temporal la rama temporal del nervio facial cruza la cara superficial del arco cigomático y luego transcurre dentro del

SMAS, superficial a la fascia temporal profunda. Por debajo del zigoma, el SMAS cubre la parótida y se continúa con el platismo. En la zona inferior de la cara los nervios motores se disponen profundos al SMAS y superficiales al masetero y al cuerpo adiposo. En la **figura 2.11** se representa un esquema de la disposición de los nervios respecto a los planos de SMAS en diferentes regiones de la cara.

Macchi et al. (2007a,b, 2010) observaron numerosos nervios en el tejido fibroadiposo profundo mientras que en el superficial solo encontraron pequeños nervios en las proximidades del corion. De acuerdo con lo anterior todos los nervios que se encuentran en el tejido conectivo fibroadiposo superficial deben de considerarse ramas del nervio trigémino o ramas anastomóticas del facial. Seguramente un caso especial lo representan los nervios que llegan a los músculos zigomáticos mayor y menor que se encuentran rodeados por un desdoblamiento del SMAS.

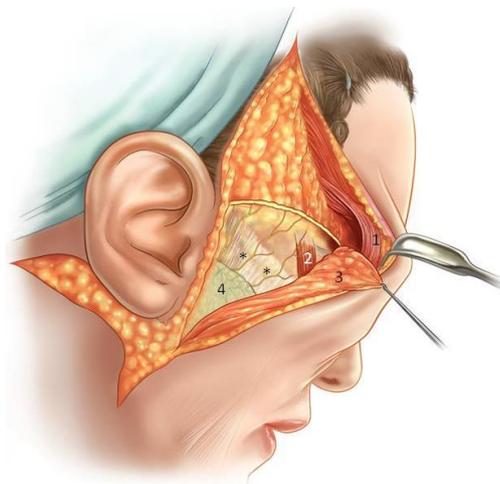


Figura 2.10.- Esquema de la disección del SMAS mostrando las relaciones con las ramas del nervio facial. 1: músculo orbicular de los papados, 2: músculo zigomático mayor, 3: colgajo conteniendo el SMAS, 4: glándula parótida, *: ramas del nervio facial. Modificada de Kahn y Bagueri (2014).

Pero existen relaciones anatómicas importantes de las ramas del nervio facial, tanto con el SMAS como con otros planos de la cara, que deben de ser tenidos

siempre en consideración al realizar intervenciones sobre estas zonas (Chow y Bennet, 2015).

Como esquema general, y teniendo en cuenta la gran variabilidad anatómica, en los siguientes párrafos se realiza una somera descripción de la anatomía topográfica y quirúrgica del nervio facial, en base a los datos elaborados a partir de los trabajos de Owsley y Agarwal (2008) y de Hwang (2014). En la misma se ha omitido la rama cervical por estar fuera del ámbito del presente trabajo.

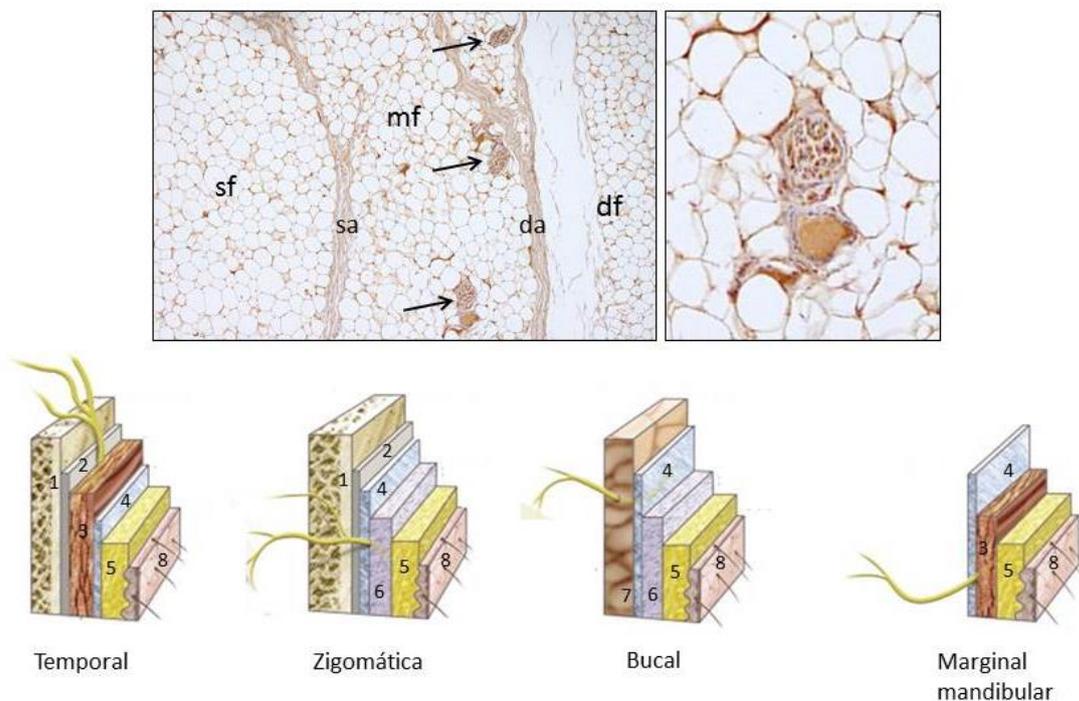


Figura 2.11.- Entre las areolas del tejido graso subcutáneo, tanto superficiales como profundas a las aponeurosis se localizan nervios de diferentes diámetros. da: aponeurosis profunda; df: grasa profunda; mf: grasa media; sa: aponeurosis superficial, sf: grasa superficial. Las flechas indican los nervios. sf: grasa superficial. En la parte inferior de la figura se observa de forma esquemática la disposición de los nervios en las diferentes regiones faciales. 1: hueso; 2: periostio; 3: músculo; 4: fascia; 5: tejido subcutáneo; 6: SMAS (sistema músculo-aponeurótico superficial; 7: glándula parótida; 8: piel. Imitado de <http://pocketdentistry.com/the-anatomy-of-the-face-mouth-and-jaws/>

Las fascias superficial y profunda de la mejilla tienden a fusionarse, sobre todo en cadáveres conservados y quizá por eso los anatomistas clásicos no tuvieron en consideración la importancia de describir el trayecto de las ramas del nervio facial y su importancia en las intervenciones sobre la cara. En cirugía, los nervios

motores se exponen ocasionalmente pero siguen casi siempre ocultos en profundidad a la fascia profunda. El trayecto general de las ramas del nervio facial se conoce por las disecciones en cadáver, pero la información obtenida en el quirófano y sobre todo el haber revisado el tema desde el punto de vista quirúrgico es de sumo interés.

Las descripciones clásicas de **ramo frontal** del nervio facial (Furnas, 1965; Pitanguy y Ramos, 1966) hacen la trayectoria de un ramo único en relación con el trago y la zona lateral de la frente. Sin embargo, se han descrito diferentes ramos, que cruzan de una forma distinta el arco zigomático (Ammurati et al., 1993; Gosain, 1995; Hwang y King, 1999; Accioli de Vasconcellos et al., 2003; Zani et al., 2003; Krayenbuhl et al., 2007). Por debajo del arco zigomático las ramas frontales están en el interior de la parótida, profundas en relación a la fascia parotídeo maseterina, mientras que en la región temporal se localizan dentro de la fascia superficial frontoparietal. Su punto de transición de la profundidad a los estratos superficiales es donde cruza al arco zigomático.

Se acepta generalmente que el SMAS por debajo del arco zigomático es análogo a y se continúa con la fascia témporoparietal (parte de fascia temporal superficial) por encima de él y que el plano de la fascia parotido-maseterica en la parte inferior es análogo a la capa superficial de la fascia temporal profunda por encima del arco. Pero aun se discute de si esas dos capas fasciales profundas son estructuras contiguas o separadas que se insertan el periostio por encima y por debajo del arco zigomático (Abul-Hussan et al., 1986; Accioli de Vasconcellos et al., 2003). Sin embargo, desde una perspectiva puramente quirúrgica las capas superficial y profunda de la fascia están adheridas entre ellas y al periostio. Teniendo en cuenta que el nervio está profundo respecto a la fascia parótidomaseterina y dentro de la fascia témporoparietal superficial

por encima de ella, la zona de transición se produce en algún punto de esta región de adherencias.

El **ramo zigomático** del facial tiene un trayecto hacia adelante dentro de la parte superior de la glándula parótida, paralelo al de la arteria cervical transversa, y sale de la glándula asociado al conducto parotídeo en profundidad a la fascia parótido-masetérica; continúa por el espacio bucal debajo del origen del músculo zygomaticus major, y termina en los músculos elevador y orbicular de los párpados (Zani et al., 2003; Lowe et al., 2005; McCord et al., 2006). Al disecar en un plano profundo al SMAS en la mejilla, el nervio zigomático está protegido por su situación intraparotídea. Su zona más vulnerable está en el borde anterior del polo cefálico de la glándula, en profundidad respecto al origen del músculo zigomático mayor, en el denominado parche de MacGregor (Furnas, 1989). En esta zona potentes ligamentos van desde el cuerpo del zigoma a través de la fascia maseterina, el SMAS y la grasa subcutánea para insertarse en la dermis.

En cuanto al **ramo bucal** del nervio facial camina en el espesor de la porción media de la glándula parótida, la abandona por su borde anterior en profundidad respecto a la fascia masetérica. Sus ramos perforan la fascia y penetran en la grasa del compartimento bucal donde inervan al músculo elevador de la cara abordándolo desde su superficie profunda.

El ramo **marginal mandibular** sale por el borde inferior de la glándula parótida, por delante o justo por debajo del ángulo de la mandíbula, a un nivel profundo a las fascias parótido-maseterina y cervical. En la mayoría de los casos sigue el borde inferior de la mandíbula profundo a la fascia maseterina. Pero en los casos en los que sale por debajo del borde inferior de la mandíbula cruza la superficie del vientre posterior del digástrico y la cápsula de la glándula

submaxilar, en profundidad con relación a la fascia cervical (Dingman y Grabb, 1962; Nelson y Gingrass, 1979).

2.6. La inervación propioceptiva de los músculos faciales

Todos los músculos del aparato locomotor contienen un sistema sensitivo intrínseco, el sistema propioceptivo, que facilita información al sistema nervioso central acerca de las condiciones estáticas y dinámicas de los músculos y las articulaciones (Dijkerman and de Haan, 2007; Butler et al., 2016). Se origina en órganos sensitivos especializados (propioceptores) que incluyen los husos neuromusculares y los órganos tendinosos de Golgi (Banks, 2015; Bewick y Banks, 2015; Proske, 2015). Además, los corpúsculos paciniformes y de tipo Ruffini que existen en las cápsulas articulares (Zimny, 1991) y los mecanorreceptores cutáneos situados en las proximidades de las articulaciones o de los músculos (Collins et al, 2005; Macefield, 2005) pueden funcionar como propioceptores.

La propiocepción es una propiedad de todos los músculos esqueléticos, incluidos los cefálicos. Pero mientras que los músculos inervados por la rama mandibular del nervio trigémino contienen propioceptores, como en el caso del masetero (Osterlund et al., 2011) o del vientre anterior del digástrico (Saverino et al., 2014), los que están inervados por el nervio facial carecen de ellos (Cattaneo and Pavesi, 2014). Sin embargo, es bien evidente que la propiocepción desempeña un papel clave en la expresión facial, regulación de la fuerza masticatoria y comportamiento oral (Wild et al., 2003; Kang et al., 2005; van der Bilt, 2011; Hontanilla y Marre, 2013; Schötz et al., 2013), así como en reflejos relacionados con el habla, la deglución, la tos, el vómito o la respiración (Miller, 2002). Además, la agudeza propioceptiva de los músculos orofaciales es superior a la de los músculos masticadores (Frayne et al., 2016).

La ausencia de este tipo de receptores en los músculos faciales es común a la mayoría de las especies de mamíferos y muy pocos trabajos han demostrado propioceptores típicos. Así, Bowden y Mahran (1960) encontraron husos neuromusculares típicos en el *quadratus labii* (2/19) y Lovell et al. (1977) los observaron en los músculos auriculares de Papio, Lagothrix y Macaca. Todos los demás autores que han estudiado el tema nunca los han visto. Los hallazgos en humanos se limitan a un huso neuromuscular en el músculo *orbicularis oculi* de un recién nacido (Nelson y Blaivas, 1991). Pero en la situación opuesta se encuentran los estudios de Kadanoff (1956) que describe la presencia de una gran variedad de receptores sensitivos, desde terminaciones nerviosas libres a husos neuromusculares, en los músculos faciales humanos, especialmente en los periorales.

Dada la ausencia de fibras aferentes propias en las ramas periféricas del nervio facial, los posibles propioceptores faciales deberían de estar inervados y depender funcionalmente de fibras aferentes del trigémino (Lazarov, 2007; Cattaneo y Pavesi, 2014) que llegan al nervio a través de las numerosas anastomosis trigémino-faciales descritas en los párrafos anteriores. Por otro lado, algunos estudios han propuesto que los mecanorreceptores cutáneos faciales podrían funcionar como propioceptores (Connor y Abbs, 1998; Collins et al., 2005; Macefiedl, 2005) pero sus características y propiedades fisiológicas hacen que no pueden ser una alternativa a los husos neuromusculares (Andreatta y Barlow, 2009; Proske y Gandevia, 2012). Por tanto, deben de existir otras formaciones o elementos nerviosos no descritos hasta la fecha que funcionen como propioceptores faciales.

Como complemento al estudio de los propioceptores en los músculos faciales se ha realizado un trabajo sobre la contribución de las neurotrofinas (NTs),

concretamente la neurotrofina 3 (NT-3) y su receptor de alta afinidad el TrkC, al desarrollo de los husos neuromusculares en los músculos faciales y masticadores de ratón. NT-3 desempeña un papel clave para el desarrollo del sistema propioceptivo (Chen y Frank 1999; Chen et al., 2003). Los ratones deficientes en NT-3 y TrkC presentan ataxia severa asociada a ausencia de husos neuromusculares, y pérdida de las neuronas propioceptivas de los ganglios raquídeos (Ernfors et al. 1994; Klein et al. 1994; Tessarollo et al. 1994; Fariñas et al. 1996; Liebl et al. 1997; Inoue et al. 2002; Levanon et al. 2002). Cuando los axones propioceptivos contactan con los miotúbulos de los músculos en desarrollo inducen la diferenciación de los husos neuromusculares y forman los diferentes tipos de terminaciones nerviosas a su alrededor. En un orden contrario de cosas, NT-3 es capaz de rescatar la pérdida de neuronas propioceptivas cuando se introduce en los músculos (Wright et al., 1997; Taylor et al., 2005).

En este contexto general, la situación de los músculos inervados por el trigémino parece ser un poco distinta. Matsuo et al. (2000) demostraron que mientras que en los sistemas esqueléticos dependientes de los ganglios raquídeos de los animales deficientes en TrkC se pierden todos los husos neuromusculares, en los inervados por el trigémino (que tienen los somas de las neuronas en el núcleo mesencefálico del trigémino y no en el ganglio de Gasser) existían husos neuromusculares y hay supervivencia del 50% de las neuronas propioceptivas del núcleo.

2.7. La inervación sensitiva de la piel de la cara

Las ramas sensitivas del nervio trigémino comentadas previamente se distribuyen por la dermis de la piel de cara para recoger diferentes tipos de modalidades sensoriales. La piel facial sigue el mismo patrón organizativo que en el resto del cuerpo, aunque posee algunas peculiaridades que han sido

recogidas en una serie de revisiones recientes (Arda et al., 2014) y que se resumen en los párrafos siguientes.

La piel de la cara está formada por dos capas principales: la superficial o epidermis (un epitelio escamoso queratinizado) y la profunda o dermis (formada por tejido conjuntivo fibroelástico) que aloja los vasos, nervios y formaciones nerviosas sensitivas. La hipodermis, es la capa más profunda y en la mayoría de los casos contiene grandes cantidades de grasa y está adherida al periostio (Figura 2.12).

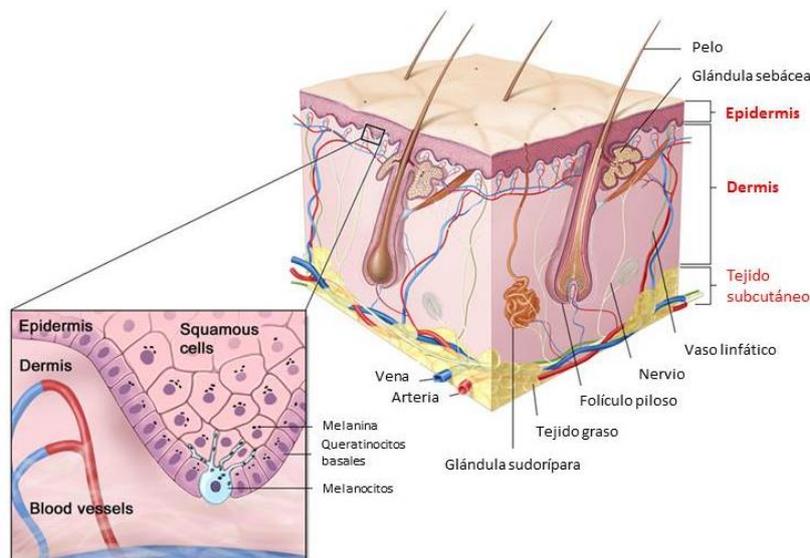


Figura 2.12.- Esquema de los estratos de la piel y de los tipos celulares de la epidermis. Modificado de <http://melanoma.surgery.ucsf.edu/conditions--procedures/melanoma.aspx>

Por otro lado, tiene diferente grosor, color y textura en las diferentes regiones. Por ejemplo, la piel de la ceja es gruesa y con fuertes pelos mientras que la del párpado es muy fina. Por si fuera poco, el grosor relativo de los diferentes estratos de la epidermis (*corneum*, *granulosum* y *spinosum*) también puede variar. Y dentro de ellos se encuentran cuatro tipos de células: los queratinocitos, los melanocitos, las células de Merkel y las de Langerhans. Para la finalidad del presente trabajo sólo se describirán en detalle las células de Merkel y su inervación. Se trata de células especiales que intervienen en el

proceso táctil y están situadas en el estrato basal de la epidermis. Derivan de la cresta neural aunque algunos autores consideran que son de origen epidérmico. Poseen un citoplasma pálido y un núcleo con invaginaciones, y están unidos a los queratinocitos por desmosomas, aunque uno de sus extremos contiene vesículas que posiblemente contienen neurotransmisores; están en contacto con los axones de las neuronas sensitivas mecanorreceptoras (Morrison et al, 2009; Nakatani et al., 2015; Woo et al., 2015).

La dermis de la piel de la cara, a diferencia de otras regiones del cuerpo, se origina de la cresta neural. En ella pueden diferenciarse dos estratos: el superficial o papilar y el profundo o reticular. En el primero es donde se encuentran los mecanorreceptores de tipo Meissner, que son particularmente numerosos en los labios. Los de tipo Pacini se sitúan en las partes más profundas de la dermis, en las proximidades de la hipodermis y los corpúsculos de Ruffini en los estratos reticulares de la dermis.

El tejido subcutáneo se dispone por debajo de la capa reticular de la dermis y está formado por tejido conectivo laxo, generalmente transformado en tejido adiposo, que forma una capa de espesor variable según la región facial, el sexo y el estado nutricional. Mantiene conexiones laxas con la fascia profunda subyacente, la aponeurosis o el periostio, y permite que la piel se deslice fácilmente sobre ellos. En condiciones de normalidad, no hay tejido adiposo en la parte subcutánea de los párpados.

Por lo que se refiere a las glándulas cutáneas faciales, son sudoríparas (eccrinas y apocrinas) y sebáceas. Las eccrinas se encuentran en el borde los labios y no están relacionadas con los pelos; por el contrario las apocrinas se disponen en relación con ellos por encima de la desembocadura de las glándulas sebáceas. En cuanto a estas últimas, están ausentes en la piel libre de pelo e íntimamente

relacionadas con los folículos pilosos, siendo particularmente abundantes en la dermis de la frente y cuero cabelludo.

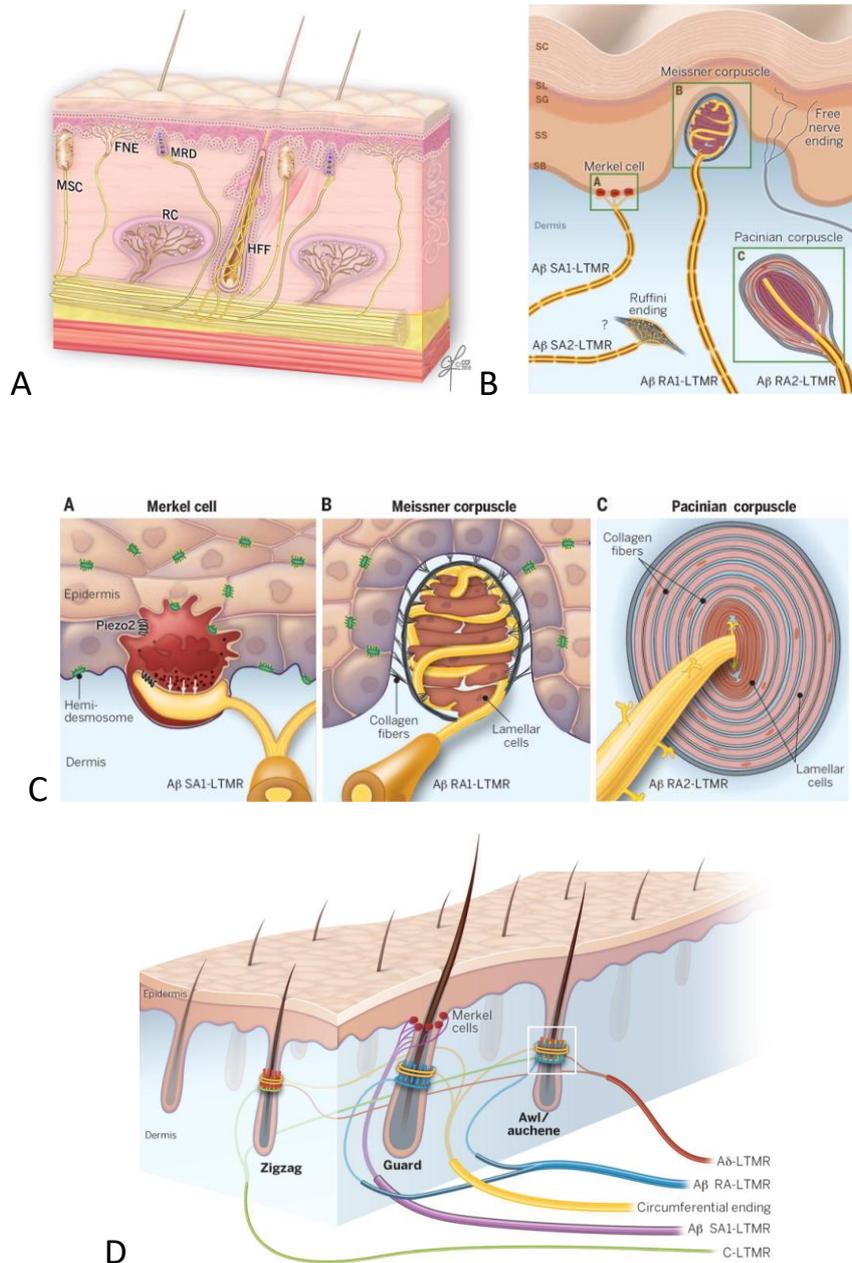


Figura 2.13.- A: Esquema de los diferentes morfotipos de corpúsculos sensitivos en la piel facial humana. FNE: terminaciones nerviosas libres; MSC: corpúsculo de Meissner; MRD: disco de Merkel; RC: corpúsculo de Ruffini. HFF: fibras nerviosas asociadas a los pelos. Tomado de Siemionow et al. (2011). **B-D:** morfotipos de corpúsculos sensitivos cutáneos e inervación de los mismos y de los pelos. Tomado de Zymmerman et al. (2014)

De especial relevancia en la piel de algunas regiones de la cara son los pelos, donde llegan a tener una densidad 10 veces superior a otras partes del cuerpo.

Los folículos pilosos derivan de la epidermis y se invaginan en profundidad en la dermis y dan origen a los pelos (vello, pelo y lanugo).

En otro orden de cosas, la piel de la cara recibe una rica inervación sensitiva que capta sensaciones de tacto, estiramiento, presión, calor, frío o dolor y, en conjunto, se puede considerar a la cara como un órgano sensitivo (Siemionow et al., 2011). Los tipos de corpúsculos sensitivos presentes en ella son terminaciones nerviosas libres, discos táctiles, nervios peritriciales, corpúsculos de Meissner y Pacini, de Kause y Ruffini (ver para una revisión Vega et al., 2009; Zimmerman et al., 2014).

En un estudio clásico sobre la inervación de la cara, Connor y Abbs (1998) afirman que esta contiene alrededor de 17.000 corpúsculos sensitivos; sería interesante saber de dónde extrapolan y deducen esos datos cuando no hemos encontrado en las bases bibliográficas habituales ni en los tratados de anatomía estudios detallados, globales o regionales, que sustenten esta afirmación. Por otro lado, estos autores no tienen en cuenta en absoluto las diferencias regionales, de edad, etnia o sexo. De cualquier forma, es obvio que en los procesos de transducción de la piel de la cara deben de participar diferentes tipos de fibras sensitivas asociados a corpúsculos sensitivos (ver Abraira y Ginty, 2013; **Figura 2.13**).

2.8. Bases moleculares de la mecanosensibilidad

Aunque la piel de la cara es capaz de recoger diferentes tipos de sensibilidad, el presente trabajo se ha centrado en la mecanosensibilidad, porque engloba aspectos tanto de tacto como de propiocepción.

El sistema somatosensorial en el que se incluye el tacto, es multimodal y proporciona a los organismos información sobre presión, temperatura, forma,

ondulación, dureza, textura, etc. Esta amplia variedad de estímulos requiere desarrollar estructuras muy especializadas para su detección, denominadas mecanorreceptores (de forma más genérica corpúsculos sensitivos) que se localizan en dermis de la piel; son terminaciones nerviosas libres, corpúsculos de Ruffini, de Meissner, de Krause y de Pacini (Munger e Ide, 1988; Zelena, 1994). Un corpúsculo sensitivo consiste en un axón central, células tipo-Schwann no mielinizantes diferenciadas y células de estirpe perineural-endoneural. Las dos categorías de células periaxónicas se organizan de diferentes maneras para configurar los distintos morfotipos de corpúsculos sensitivos. Cada una de esas tres porciones principales comparte las propiedades inmunohistoquímicas de las partes de las fibras nerviosas de las que se originan (ver Vega et al., 1996, 2009). En los mamíferos, los corpúsculos de Pacini y Meissner, así como los corpúsculos sensitivos asociados a los pelos y las células de Merkel, funcionan como receptores de bajo umbral y adaptación rápida y lenta, respectivamente, sensibles al tacto y a la vibración, o a cambios groseros en la presión y la vibración (Johnson, 2001). Dependen de fibras nerviosas $A\alpha$ o $A\beta$ (Roudaut et al., 2012; Fleming y Luo, 2013; Abaira y Ginty, 2013).

Actualmente se conoce bastante bien la composición proteica de los corpúsculos sensitivos (Vega et al., 1996, 2009; Pawson et al., 2000) pero sólo en los últimos años se han identificado en estas estructuras algunas proteínas relacionadas directamente con la mecanosensibilidad: canales iónicos que se abren o cierran en respuesta a la deformación física de la membrana celular (Montaño et al., 2009; Calavia et al., 2010; Cabo et al., 2012, 2013, 2015; Alonso-González et al., 2016).

La detección de los estímulos mecánicos en la piel se produce a través de la activación de canales iónicos presentes en las membranas de las células

mecanosensibles (Lumpkin y Caterina, 2007; Tsunozaki y Bautista, 2009; Lumpkin et al., 2010; véase también Gu y Gu, 2014; Paluch et al., 2015). Deformaciones en la membrana de las diferentes células que forman los mecanorreceptores producen la apertura o cierre de canales que regulan flujos de iones y esta respuesta es uno de los mecanismos básicos de la mecanotransducción (Lumpkin and Caterina 2007; Lumpkin et al., 2010; Delmas y Coste, 2013; Honoré et al., 2015; Ranade et al., 2014, 2015). Sin embargo, no se ha establecido de manera definitiva si estos canales iónicos actúan directamente como mecanosensores o si solamente son necesarios para la mecanosensación. En la actualidad, se consideran potenciales canales mecanosensibles a algunos miembros de la superfamilia de los Canales Epiteliales de Sodio/Degenerinas (Deg/ENa⁺C, Degenerin/Epithelial Na Channel), de la superfamilia de canales de Receptor de Potencial Transitorio (TRP, Transient Potential Receptor), de la familia canales de potasio de dominio de 2 poros (Kp2, como los canales TRAAK y TREK-1) y los productos de los genes Piezo1 y Piezo2, (Gillespie and Walker, 2001; Lumpkin and Caterina, 2007; Arnadottir and Chalfie, 2010; Coste et al., 2010; Lumpkin et al., 2010; Del Valle et al., 2012; Delmas y Coste, 2013; Ranade et al., 2014; Sharif-Naeini, 2015).

3. Objetivos

3. Objetivos

El **objetivo general** del estudio es contribuir al conocimiento de la neuroanatomía de la cara, y como **objetivos específicos** se han planteado los siguientes:

- 1.- Estudiar las comunicaciones de los nervios facial y trigémino mediante disecciones e investigar la posible significación funcional de las mismas.
- 2.- Realizar un mapa topográfico de las ramas de los nervios facial y trigémino respecto al sistema musculo-aponeurótico superficial de la cara.
- 3.- Estudiar la inervación propioceptiva de los músculos faciales inervados por los nervios facial y trigémino
- 4.- Analizar el desarrollo de los propioceptores faciales en modelos de ratón deficientes en factores de crecimiento (sistema NT-3/TrkC).
- 5.- Establecer la inervación sensitiva, especialmente la mecanosensitiva, de la piel de la cara.
- 6.- Estudiar mediante resonancia magnética la distribución de las ramas de los nervios facial y trigémino en la cara.

4. Material y técnicas

4. Material y técnicas

4.1. Material

Para la realización del trabajo se utilizó material humano procedente de cadáveres fijados, cadáveres frescos y piezas quirúrgicas, y material de ratones normales (en adelante *NT3+/+* y *TrkC+/+*) y portadores de una mutación no funcional en el gen que codifica para la neurotrofina-3 (NT-3) y su receptor de alta afinidad TrkC (*NT3-/-* y *TrkC-/-*). Todos los procesos y técnicas de los diferentes estudios se desarrollaron en las dependencias y laboratorios del Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Oviedo y del Dipartimento di Scienze Veterinaria (Sezione di Anatomia) de la Università di Messina.

Además se realizó un estudio de resonancia magnética en 5 individuos (3 mujeres y 2 hombres) de edades comprendidas entre los 22 y los 60 años.

4.1.1. Material humano: obtención y procesado de las piezas

En los estudios de disección para establecer la anatomía superficial de los nervios facial y trigémino, así como las conexiones superficiales entre ellos, se utilizaron 10 hemicabezas procedentes de cadáveres fijados, obtenidas del Área de Anatomía y Embriología Humana del Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Oviedo. Correspondían a 3 varones y 2 mujeres, adultos, de edades comprendidas entre los 58 y 79 años.

Además, se emplearon piezas de diferentes partes de la cara que incluyen el espesor completo de las mismas (desde piel a periostio o mucosas), porcedentes de 5 hemicaras de cadaveres 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). Correspondian a 3 varones y dos

mujeres, de edades comprendidas entre los 46 y 81 años. 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 fue lavado en agua corriente fría durante 1 hora, dividido en segmentos y fijado durante 48 h en formol 1l 10% tamponado (pH 7,4).

Finalmente, se utilizaron muestras quirúrgicas de piel de la cara (mejilla) de pacientes atendidos en Urgencias del Hospital Universitario Central de Asturias por el Servicio de Cirugía Plástica, que requirieron la resección de algunos pequeños segmentos de la piel de la cara. En total se dispuso de un total de 7 muestras, todas ellas procedentes de varones, de edades comprendidas entre los 26 y 44 años. Las piezas se lavaron en agua corriente fría durante 1 hora y fueron fijadas durante 24 h en formol al 10% tamponado (pH 7,4). Como controles positivos en todos los procesos se incluyeron muestras de piel de los pulpejos de los dedos (Histoteca del Grupo SINPOS, Universidad de Oviedo).

Todos los tejidos utilizados fueron obtenidos de acuerdo con la legislación española y las directrices de la Declaración de Helsinki II.

Tras el proceso inicial de lavado y fijación, las piezas procedentes de cadáveres congelados se lavaron en agua corriente durante 1h, se deshidrataron y se incluyeron en parafina mediante procedimientos de rutina. Brevemente, las piezas se pasaron por 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 con isopropanol (100%: 30 min x 3) y se pasaron por parafinas blanda (30 min a 55° C) y dura (2 horas a 60° C). Los bloques de parafina con 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 tricrómico de Masson, y de inmunohistoquímica y de inmunofluorescencia. Las

secciones obtenidas fueron recogidas sobre portaobjetos gelatinizados y secadas en estufa a 45° C durante 24h como mínimo antes de ser utilizadas.

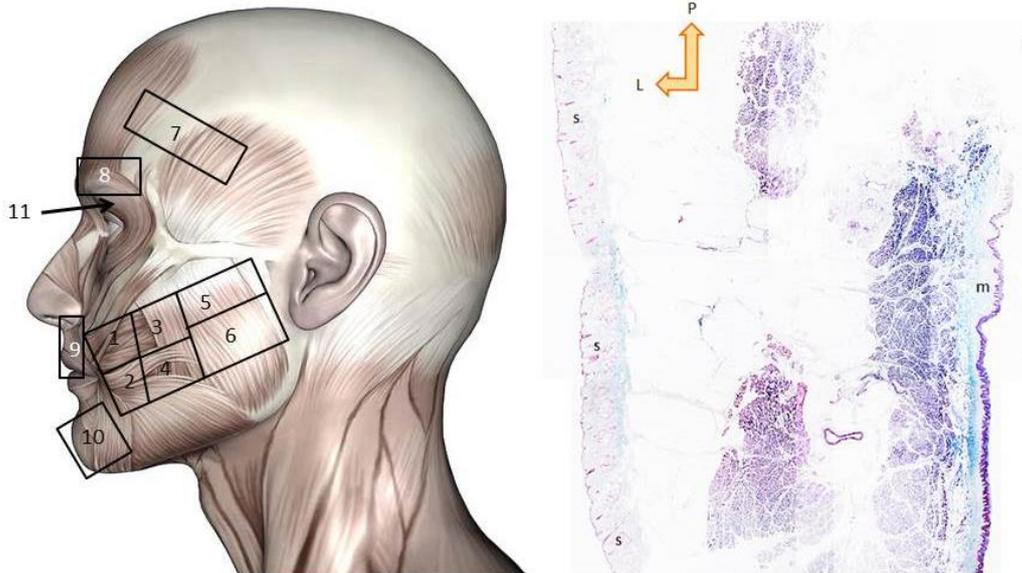


Figura 4.1.- Regiones de la cabeza de la que se obtuvieron las piezas de estudio de los cadáveres no fijados. Todas ellas incluyen la totalidad de los planos histológicos de la región (hemos hueso). Cada una fue orientada correctamente antes de la inclusión en parafina. En la sección histológica de la derecha se observa una sección procesada por el método del tricrómico de Masson que incluye la totalidad del espesor de la pared de la mejilla desde piel (s) hasta la mucosa oral (m). L: lateral; P: posterior.

Para la rehidratación de los cortes se procedió a la eliminación de la parafina mediante el pase de los portaobjetos con las secciones por xilol al 100% (20 min x2) y por una batería de alcoholes de gradación decreciente (de 10 min cada uno) hasta agua corriente (20 min). A continuación, sobre algunas secciones se realizó una tinción rutinaria de hematoxilina y eosina, para ver la estructura general del tejido ó facilitar la selección de los cortes 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) y de 7 15 días postnatales, proporcionados por la Prof. Isabel Fariñas (Universidad de Valencia) y 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) 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 paraformaldehído 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. Disección

La disección de las hemicaras se llevó a cabo en la sala de disección de la Sección de Anatomía y Embriología del Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Oviedo. Los cadáveres habían sido fijados mediante perfusión y conservados en formol al 5% durante periodos de tiempo superiores a 6 meses. Las incisiones cutáneas se realizaron de la forma más adecuada para la preservación y localización de las ramas del nervio facial. Por otro lado, se puso especial atención en la identificación de las posibles comunicaciones entre los nervios facial y trigémino. El trabajo se realizó por 3 disectores bajo la instrucción de un profesor de anatomía.

4.2.2. 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.

4.2.3. Técnicas de inmunohistoquímica

4.2.3.1. Inmunoperoxidasa indirecta mediante la técnica de la PAP

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 mediante una solución en tampón de H₂O₂ al 3% durante 10 minutos, y las secciones se lavaron en el mismo tampón durante 10 minutos; inmediatamente después se bloquearon las uniones inespecíficas con albúmina de suero bovino al 10% durante 20 minutos. Sin lavar, las secciones fueron incubadas durante la noche a 4° C, en cámara húmeda, con los anticuerpos primarios que se incluyen en la Tabla 3.1. Tras la incubación con el anticuerpo primario, las secciones se lavaron en TBS 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). 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.

Tabla 3.1.- Anticuerpos 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-cromogranina	Ratón	PD	Dako ²
Anti- CK20	Ratón	PD	Dako ²
Anti-SPHY	Ratón	PD	Dako ²
Anti-TRPV4	Conejo (1)	1:100	Abcam ³
Anti-ASIC2	Conejo	1:200	Lifespan Biosciences ⁴
Anti-Piezo2	Conejo (3)	1:100	Sigma-Aldrich, Spain ⁵

¹Santa Cruz, CA, USA; ²Glostrup, Denmark; ³Cambridge, UK; ⁴Seattle, WA, USA; ⁵Madrid, España.

PD: prediluido

(1) secuencia: dominio N-terminal citoplasmático de RPV4 conjugado con una proteína inmunogénica transportadora

(2) secuencia: peptide sintético del dominio extracelular de ASIC2 de ratón conjugado con una proteína inmunogénica transportadora

(3) secuencia: FEDENKAAVRIMAGDNVEICMNLDAASFQHNP

4.2.3.2. Doble inmunofluorescencia

Con el objeto de establecer con exactitud la localización de las proteínas mecanorreceptoras en las estructuras sensitivas de los músculos faciales y en la piel se realizó doble inmunofluorescencia. Las secciones fueron desparafinizadas, hidratadas y lavadas 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, anti-TRPV4 y anti-Piezo2 y anti-S100 (Dako, monoclonal, diluido 1:500, que marca las células satélites de los ganglios raquídeos y las células Schwann-like de los corpúsculos de Meissner y Pacini); anti-Piezo2 y anti-neurofilamento (Dako, monoclonal, diluido 1:1000); anti-ASIC2, anti-TRPV4 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 y gástrico se procesaron para su inclusión en resina Durcupan® (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. 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 el Dipartimento di Scienze Veterinarie de la Università di Messina.

4.2.5. Análisis cuantitativo

En las secciones completas de las diferentes regiones faciales teñidas mediante la técnica del tricómico de Masson 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). Siguiendo el protocolo propuesto por Macchi et al. (2007) se en cada región del tejido subcutáneo se analizaron los siguientes parámetros: espesor medio del tejido subcutáneo, espesor del tejido conectivo fibroadiposo superficial y profunda, espesor de la fascia superficial y de los septos conectivos y se midió el área de los lóbulos adiposos superficiales y profundos.

Además se realizó un conteo de todos los perfiles nerviosos en 5 secciones completas de cada una de las zonas anatómicas procesadas para la detección de la proteína S100, separadas 200 μm entre ellas. Cada perfil nervioso fue medido y clasificado como de pequeño (< 20 μm), mediano (21-50 μm) o gran (> 51 μm) diámetro.

4.3. Estudio de resonancia magnética

Los sujetos fueron estudiados mediante resonancia magnética con un sistema de T 3.0 (Philips Achieva, Philips Medical Systems, Best, Holanda). De cada caso se obtuvieron imágenes axiales y coronales T1 y T2 e imágenes del eco del campo rápido de equilibrado axial.

5. Resultados

5. Resultados

5.1. Anatomía macroscópica del nervio facial

5.1.1. Patrones de ramificación del nervio facial

El patrón de ramificación del nervio facial en las 10 hemicabezas se determinó mediante disección detallada y por comparación con los patrones establecidos en 1956 por Davies et al. (**Figuras 5.1 a 5.4**)



Figura 5.1 y 5.2.- Fases del proceso de disección del nervio facial en una hemicara izquierda correspondiente a un hombre de 68 años.

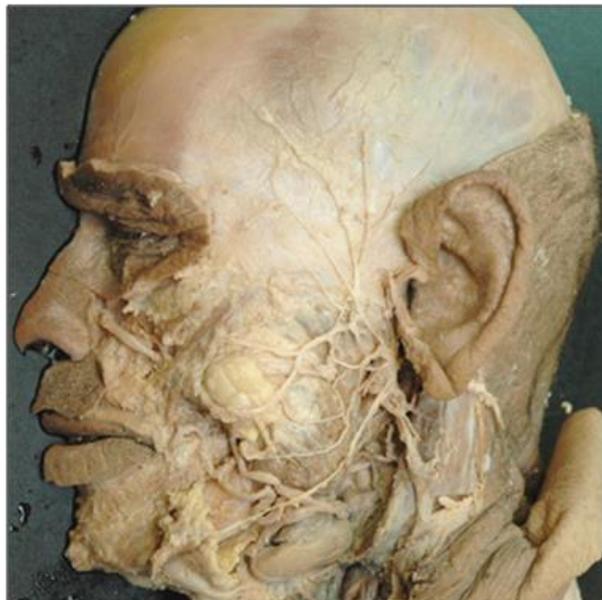


Figura 5.3 y 5.4.- Figura Fases del proceso de disección del nervio facial en una hemicara izquierda correspondiente a un hombre de 68 años.

Una vez aisladas e identificadas todas las ramas del nervio facial se procedió a la eliminación de los restos de grasa de la cara y de la bola adiposa de Bichat, con el fin de aislar todas las uniones entre los nervios facial y trigémino (**Figuras 5.5 y 5.6**).

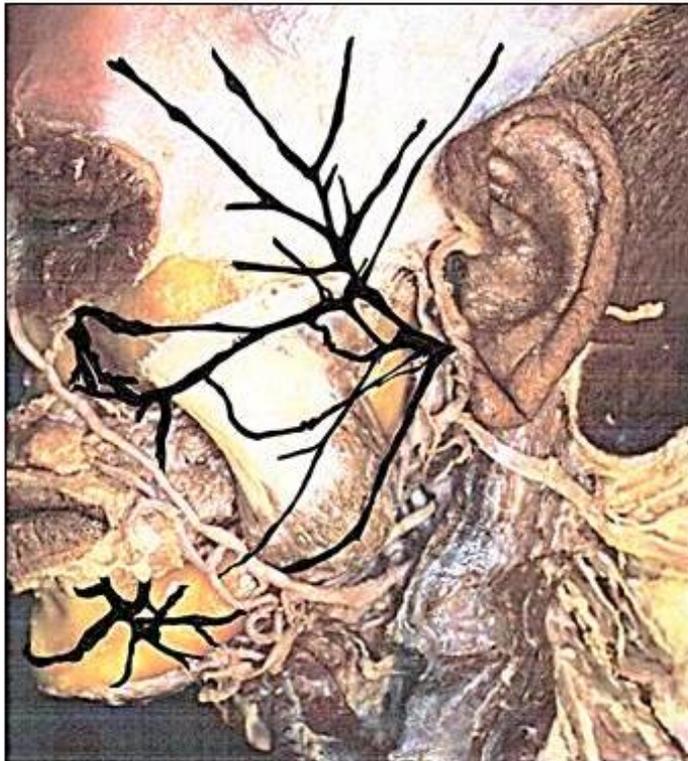


Figura 5.5 y 5.6.- Imágenes definitivas de la disección del nervio facial (varón de 67 años) y sus comunicaciones con el nervio trigémino. En la parte inferior se ha coloreado en negro el nervio facial y las comunicaciones trigémino-faciales.

De acuerdo con los hallazgos de las disecciones, en nuestra casuística la distribución de los nervios faciales por tipo de ramificación se recoge en la **tabla 5.1**, y en todos los casos se observó la división primaria del tronco nervioso en dos porciones: superior o temporofacial e inferior o cervicofacial.

Caso	Sexo	Edad	Hemicara derecha	Hemicara izquierda
1	H	62	Tipo V	Tipo II
2	H	74	Tipo II	Tipo II
3	H	67	Tipo IV	Tipo II
4	M	58	Tipo IV	Tipo II
5	M	79	Tipo II	Tipo IV

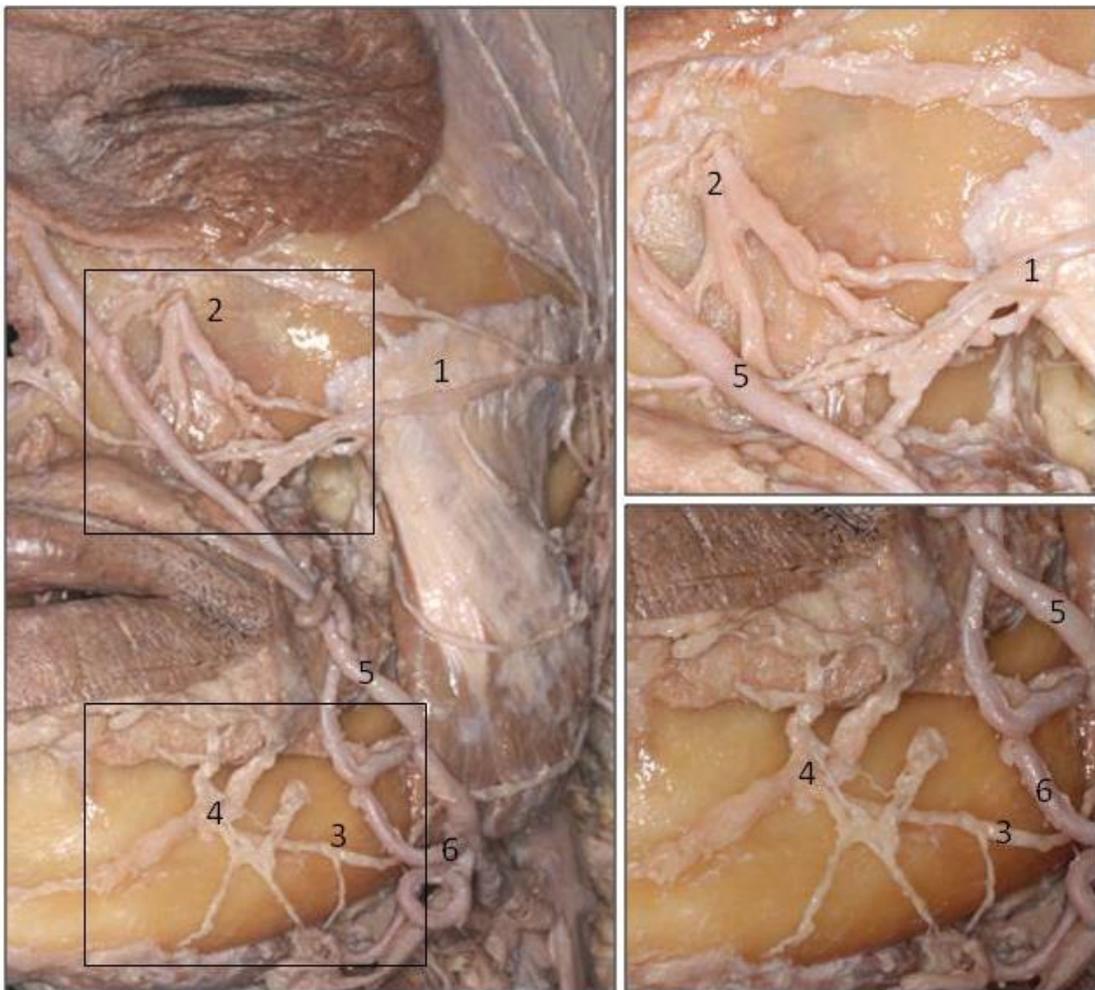
Tabla 5.1.- Distribución de los tipos de ramificación del nervio facial en las 10 hemicabezas disecadas en el presente trabajo

En nuestro estudio el tipo de arborización del nervio facial predominante correspondió al tipo II (6/10), seguido de los tipos IV (3/10) y de tipo V (1/10). En el primer caso los ramos temporal y zigomático se originan del tronco superior, y los ramos bucal, marginal mandibular y cervical del inferior, con uniones distales entre las ramas del tronco superior. Las arborizaciones de tipo IV (**Figuras 5.5.** y **5.6**) se caracterizan por abundantes uniones de la rama bucal con las ramas del tronco primario témporo facial. Y en la de tipo V las ramas temporal, zigomática y bucal presentan numerosas comunicaciones distales. Con independencia de la tipificación observada, en todos los casos se encontraron pequeños ramos de comunicaciones entre las diferentes ramas terminales del nervio facial en varias porciones de su recorrido.

5.1.2. Comunicaciones trigémino-faciales

En la literatura científica se han descrito numerosas variaciones en las comunicaciones entre las ramas del nervio facial y del nervio trigémino, que varían en porcentaje según se trate de cadáveres fijados o frescos, o que se realice la técnica de Shiler de impregnación argéntica.

En el material utilizado en nuestro trabajo, a pesar de haber puesto el máximo cuidado en el aislamiento de los ramos nerviosos y en el seguimiento de su trayecto sólo hemos observados dos tipos de uniones triémimo-faciales: entre la rama infraorbitaria del nervio trigémino y el ramo zigomático del facial, y entre el nervio dentario inferior (mentoniano) del trigémino y el marginal mandibular del facial (**Figura 5.7**). Estas dos uniones se encontraron en todos los casos (10/10).



Figuras 5.7 (izquierda) y 5.8 (derecha).- Uniones infraorbitaria y mentoniana entre los nervios facial y trigémino. 1: rama zigomática del nervio facial, 2: ramo infraorbitario del nervio trigémino, 3: rama marginal mandibular del nervio facial, 4: ramo mentoniano del nervio trigémino, 5: vena facial, 6: arteria facial.

5.2. Anatomía topográfica y regional de los nervios de la cara: relaciones con los planos músculo-aponeuróticos faciales

5.2.1. Descripción y espesor relativo de los planos

En las diferentes regiones faciales estudiadas se ha realizado un detallado análisis morfométrico de los espesores de los estratos de las paredes de la cara, del grosor de los tabiques verticales y horizontales, del tamaño de las celdillas del tejido graso y de los nervios observados en cada una de las zonas, poniendo especial interés en su localización en el interior o en estrecho contacto con el SMAS. En los troncos nerviosos se determinó además el diámetro. Lógicamente fue imposible determinar con las técnicas utilizadas qué fibras nerviosas son de origen facial, cuáles corresponden al trigémino o si algunos troncos están formados por fibras procedentes de ambos nervios.

Los datos se presentan en forma de anagramas basados en los de los trabajos de Macchi et al. (2010), utilizando un esquema ideal sin correspondencia con los valores relativos obtenidos. Además, los resultados para las mediciones de las celdillas grasas y de los nervios se presentan en forma de tablas que resumen los hallazgos en cada zona de la cara.

En las páginas que siguen, se ilustran mediante secciones seriadas la estructura histológica de las varias regiones faciales y de las secciones procesadas para la detección de los nervios en las mismas. Son cortes histológicos a bajo aumento que tienen por finalidad efectuar el análisis topográfico de los nervios y establecer la estratigrafía de las zonas de la cara. Los detalles de mayor interés se presentan en otras fotos que permiten apreciarlos con claridad.

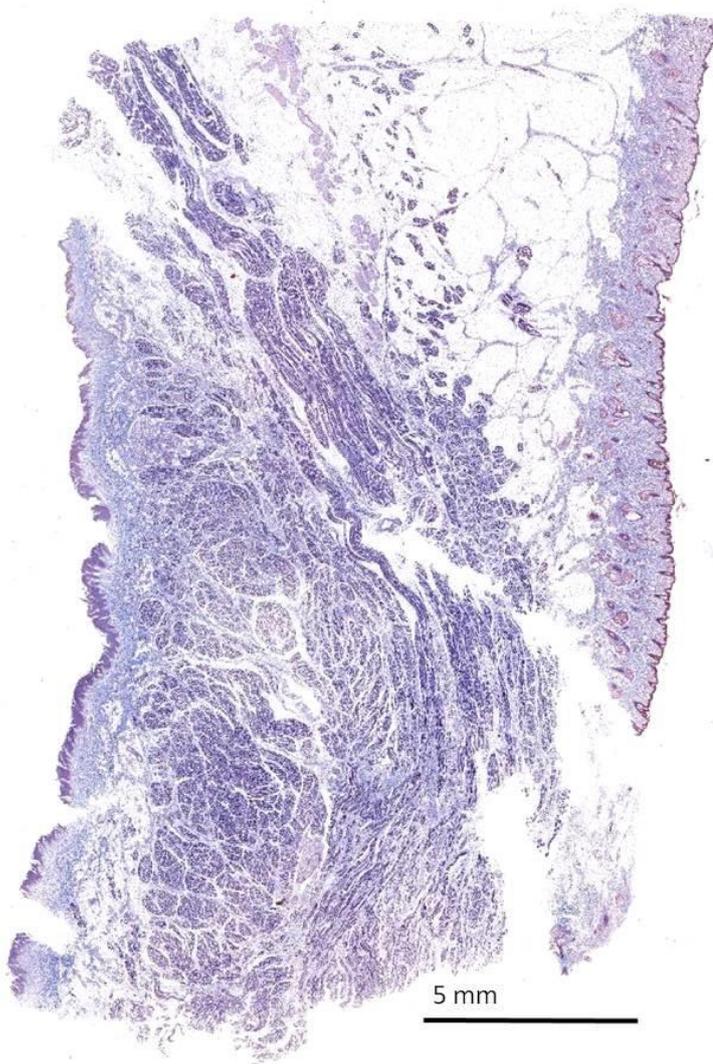


Figura 5.9.- Cara – segmento 1. Tricrómico de Masson



Figura 5.10.- Cara – segmento 1. Detección inmunohistoquímica de NFP

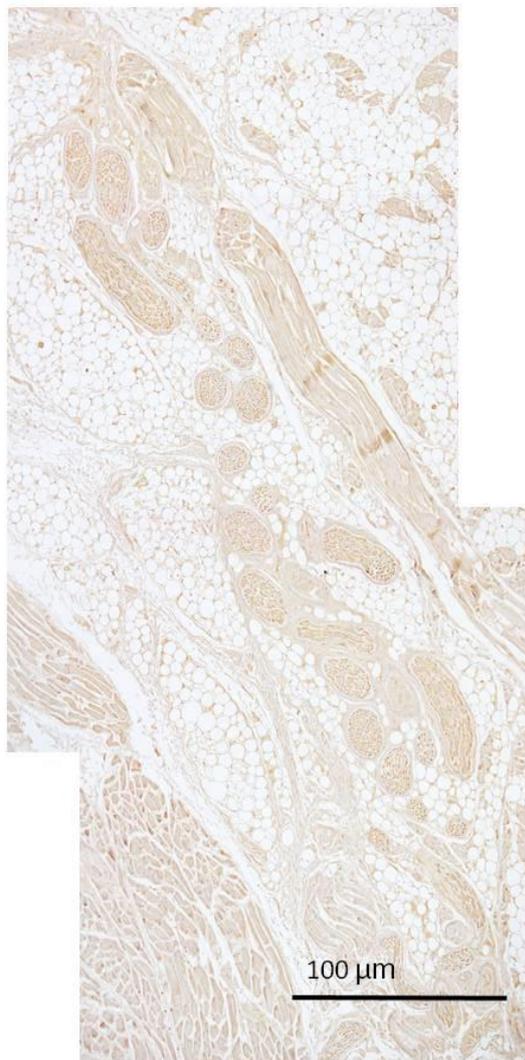


Figura 5.11.- Cara – segmento 1. Detección inmunohistoquímica de NFP.
Detalle de la figura anterior

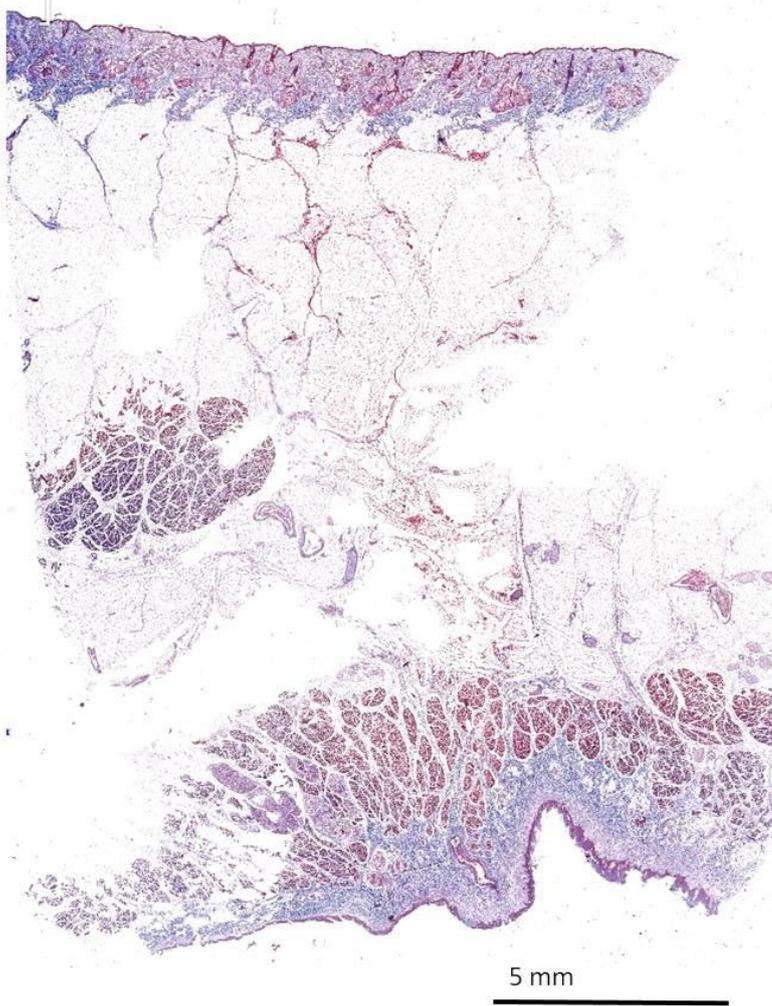


Figura 5.12.- Cara – segmento 2. Tricrómico de Masson

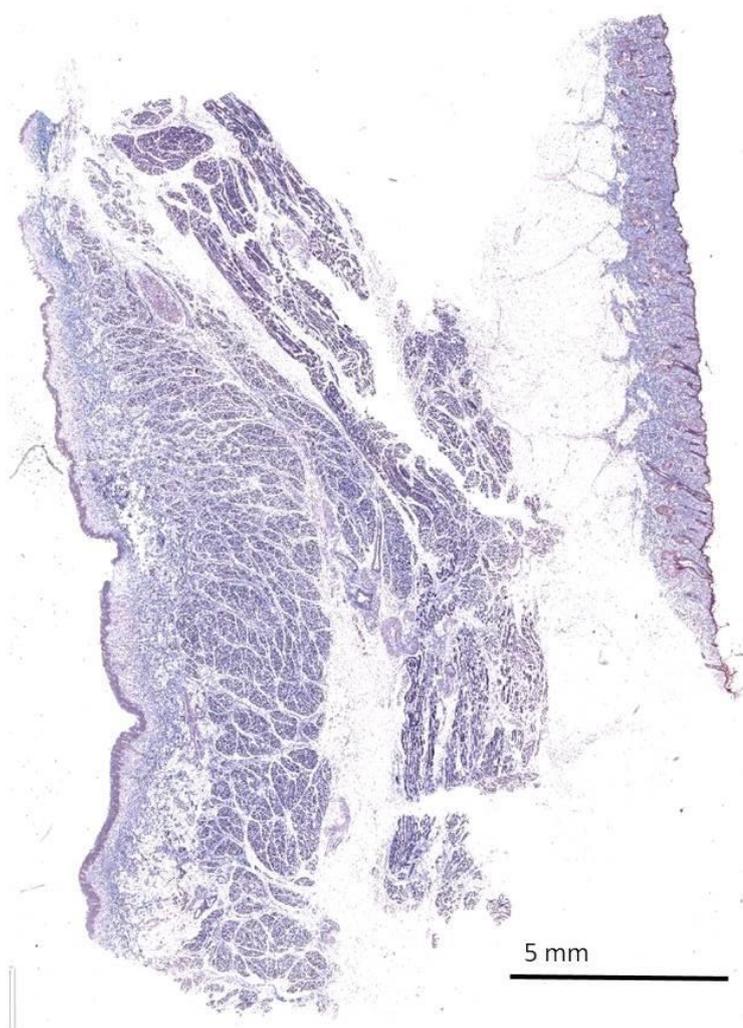


Figura 5.13.- Cara – segmento 2. Tricrómico de Masson



Figura 5.14.- Cara – segmento 2. Detección inmunohistoquímica de NFP

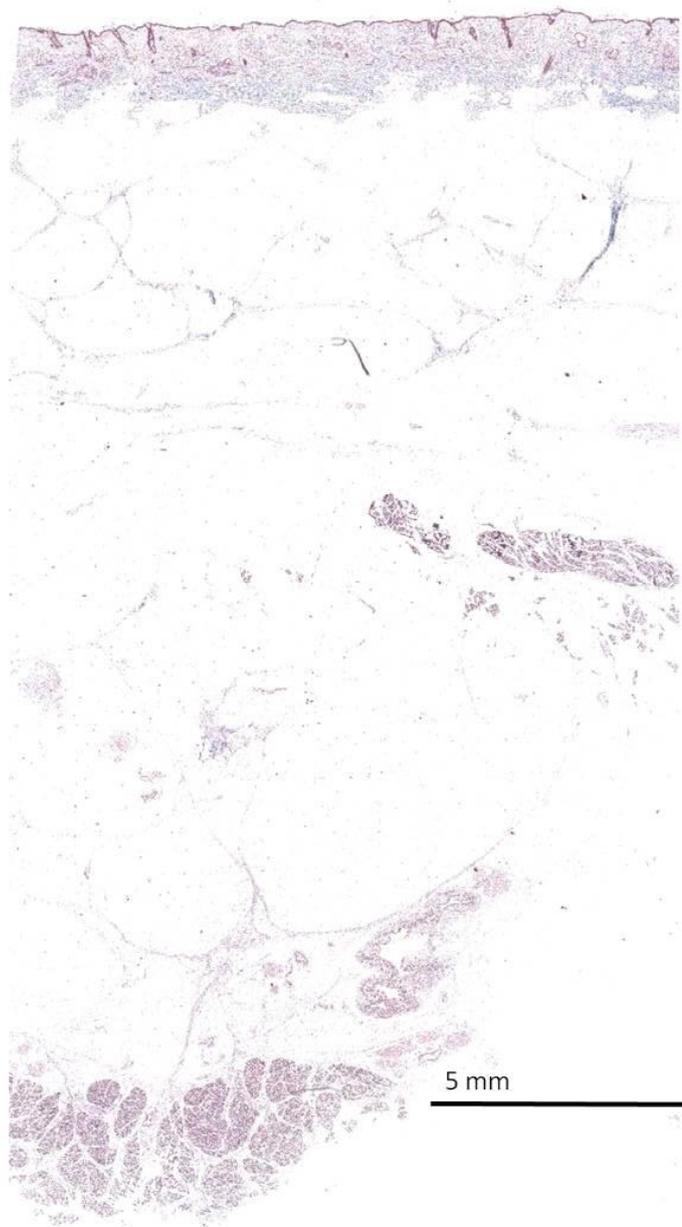


Figura 5.15.- Cara – segmento 3. Tricrómico de Masson

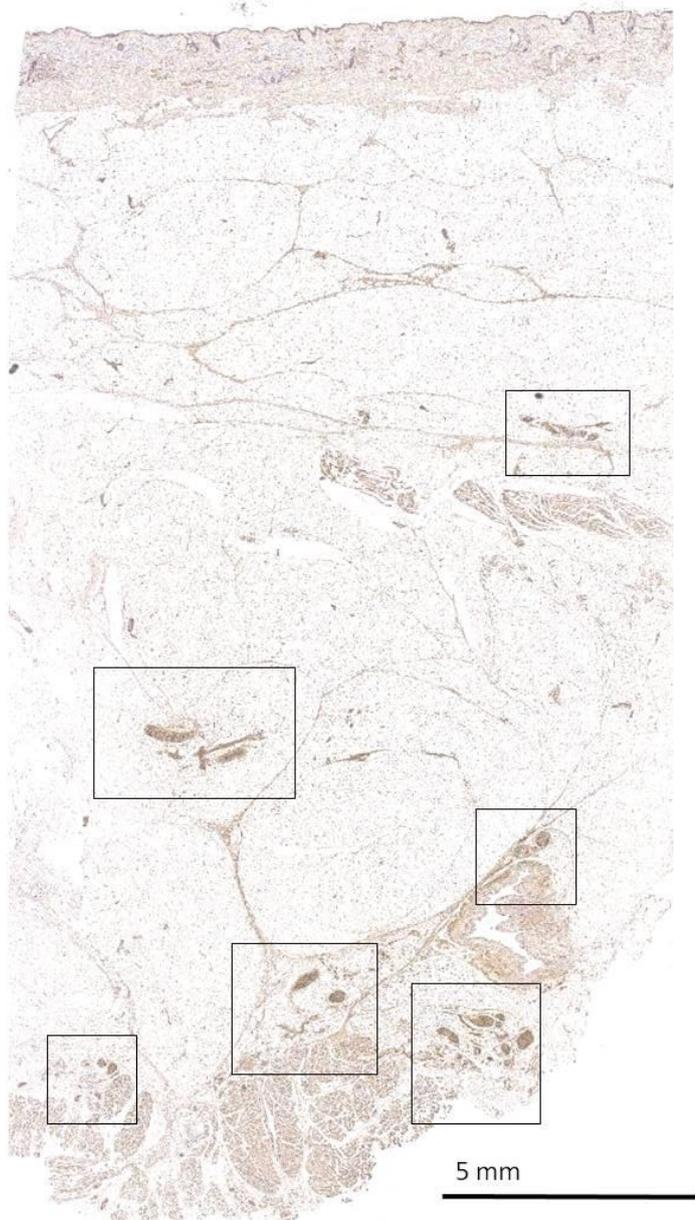


Figura 5.16.- Cara – segmento 3. Detección inmunohistoquímica de S100P

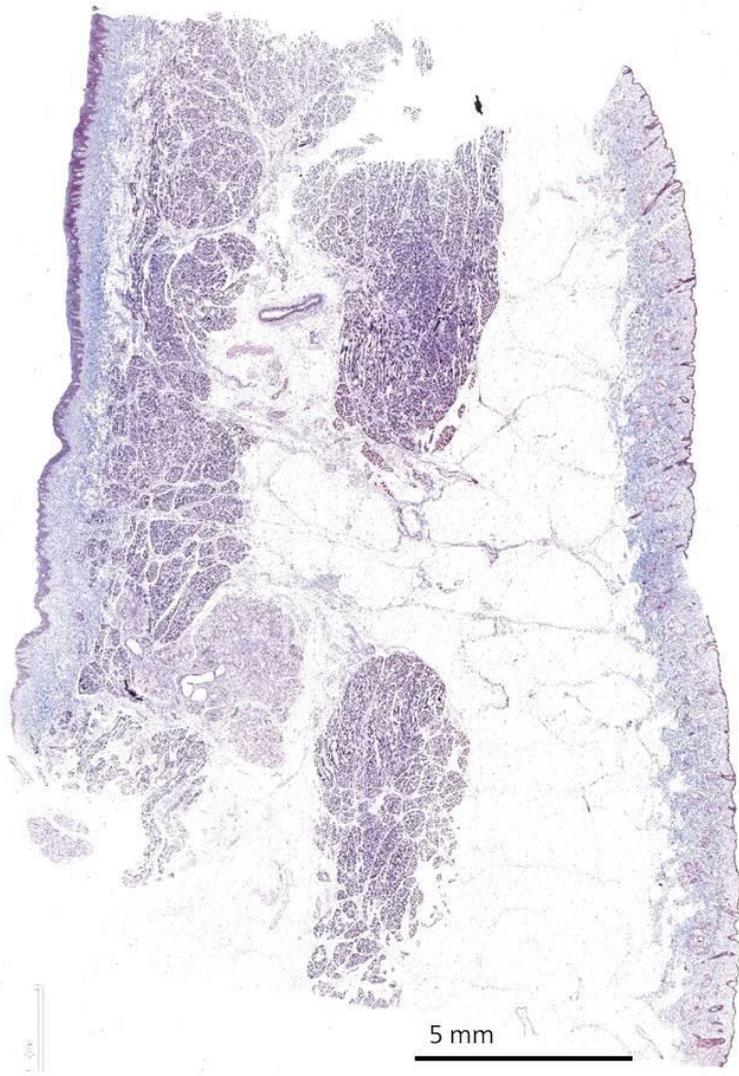


Figura 5.17.- Cara – segmento 4. Tricrómico de Masson

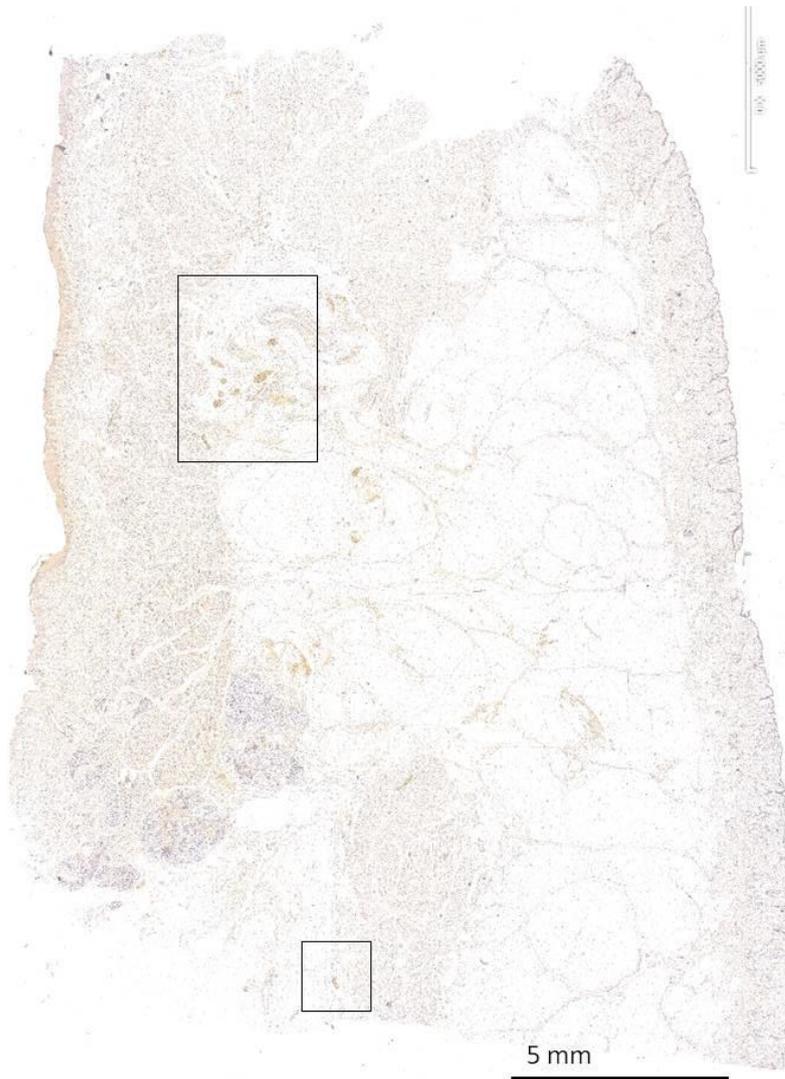


Figura 5.18.- Cara – segmento 4. Deteccion inmunohistoquimicas de S100P

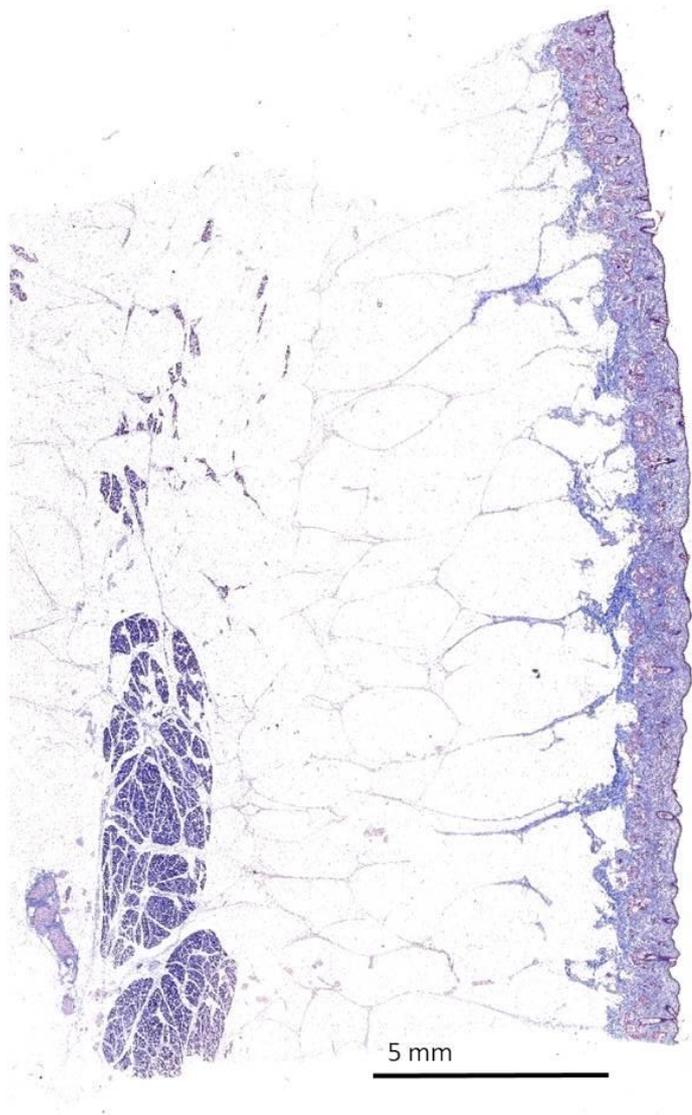


Figura 5.19.- Cara – segmento 4. Tricrómico de Masson

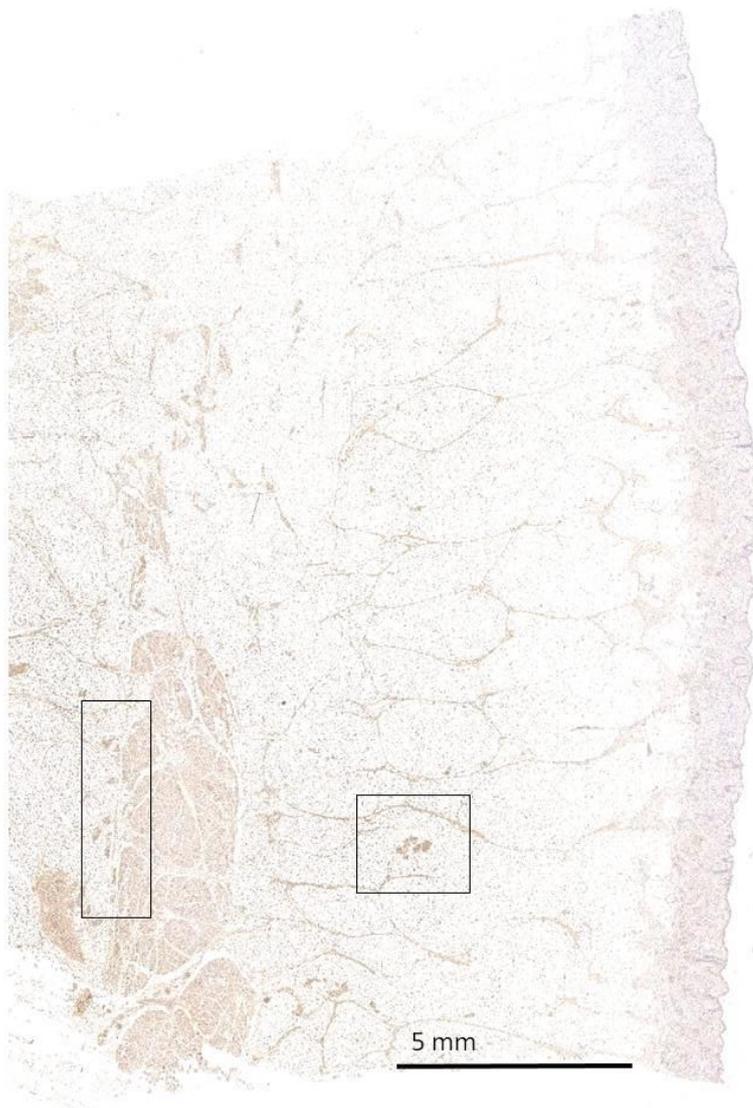
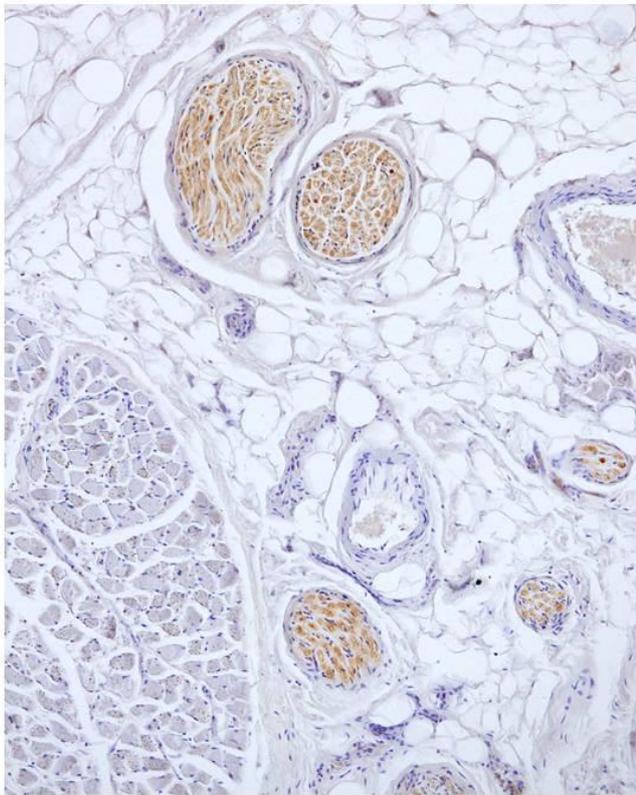


Figura 5.20.- Cara – segmento 4. Detección inmunohistoquímica de S100P



50 μ m

Figura 5.21.- Cara – segmento 4. Detección inmunohistoquímica de S100P. Detalle de la figura anterior

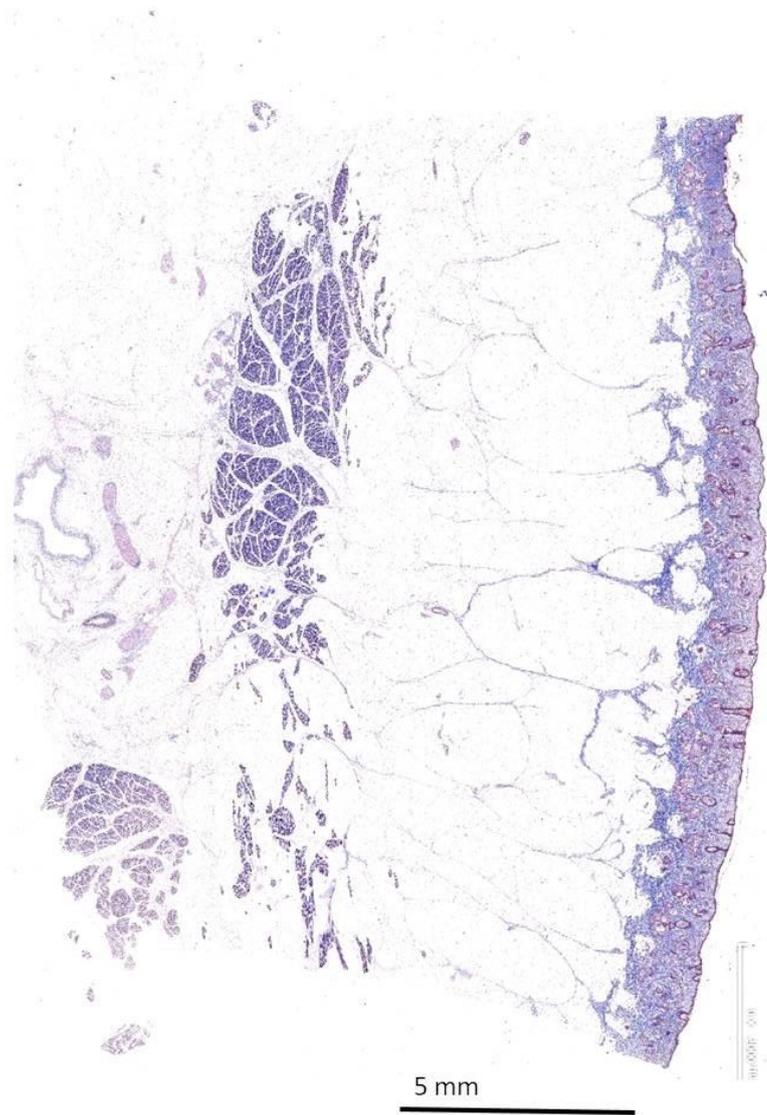


Figura 5.22.- Cara – segmento 4. Tricrómico de Masson

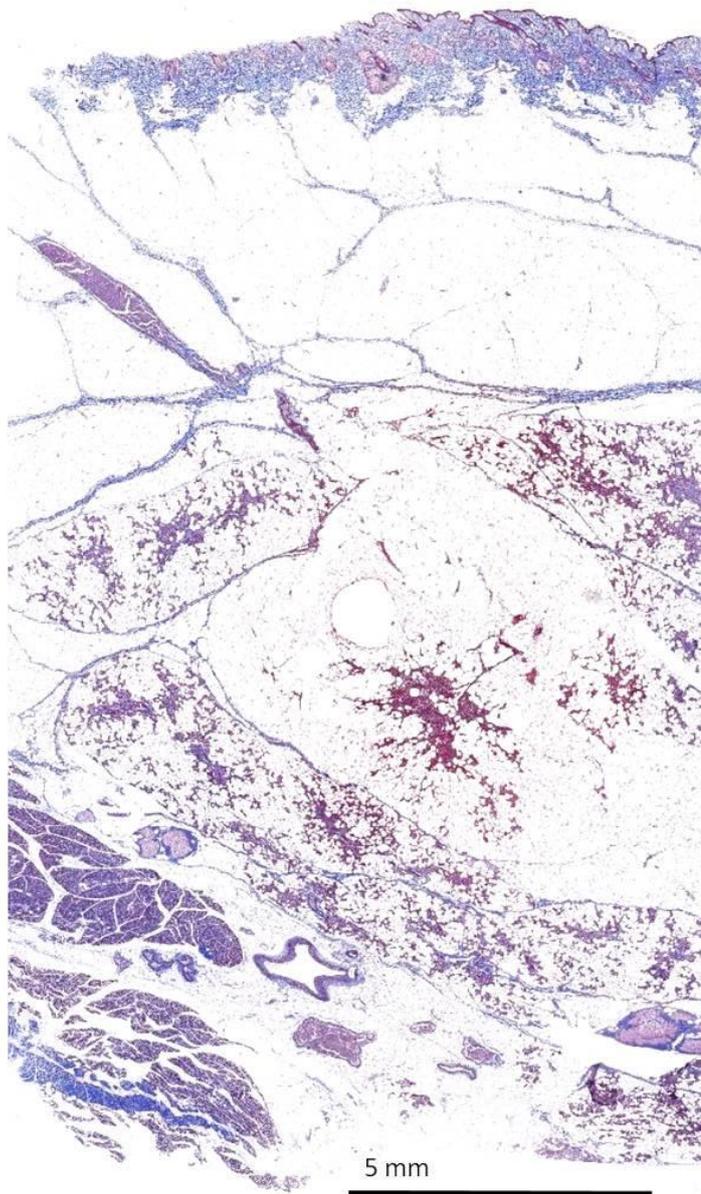


Figura 5.23.- Cara – segmento 5. Tricrómico de Masson

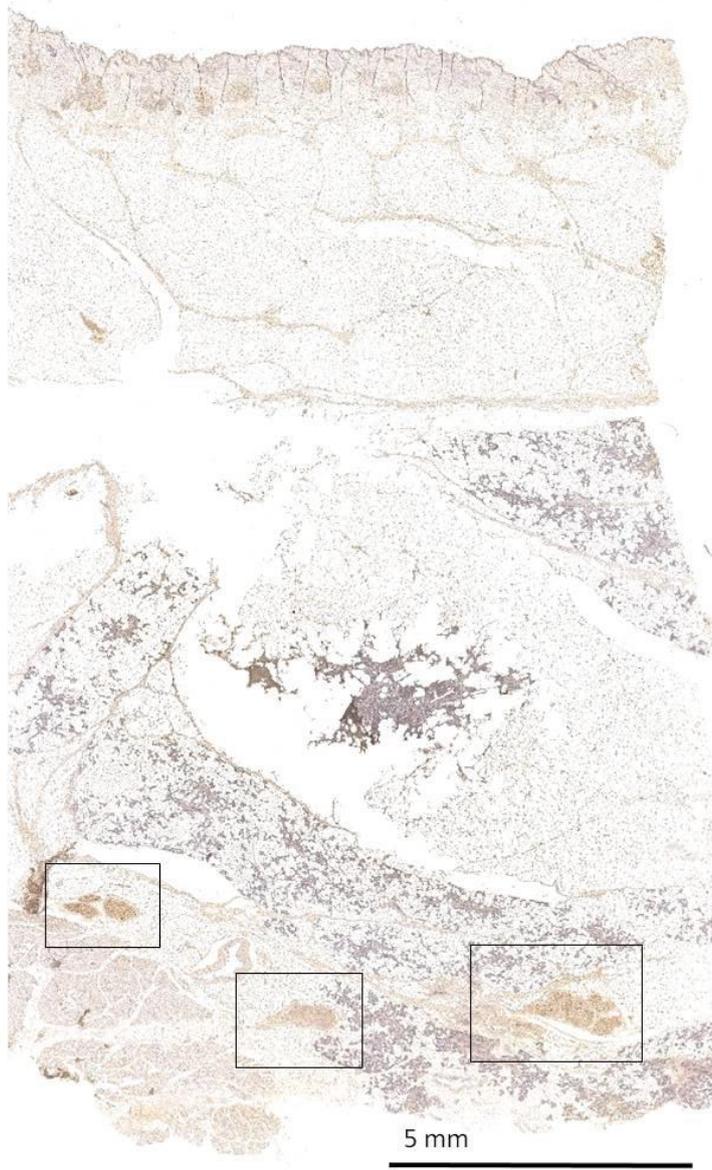


Figura 5.24.- Cara – segmento 5. Detección inmunohistoquímica de S100P

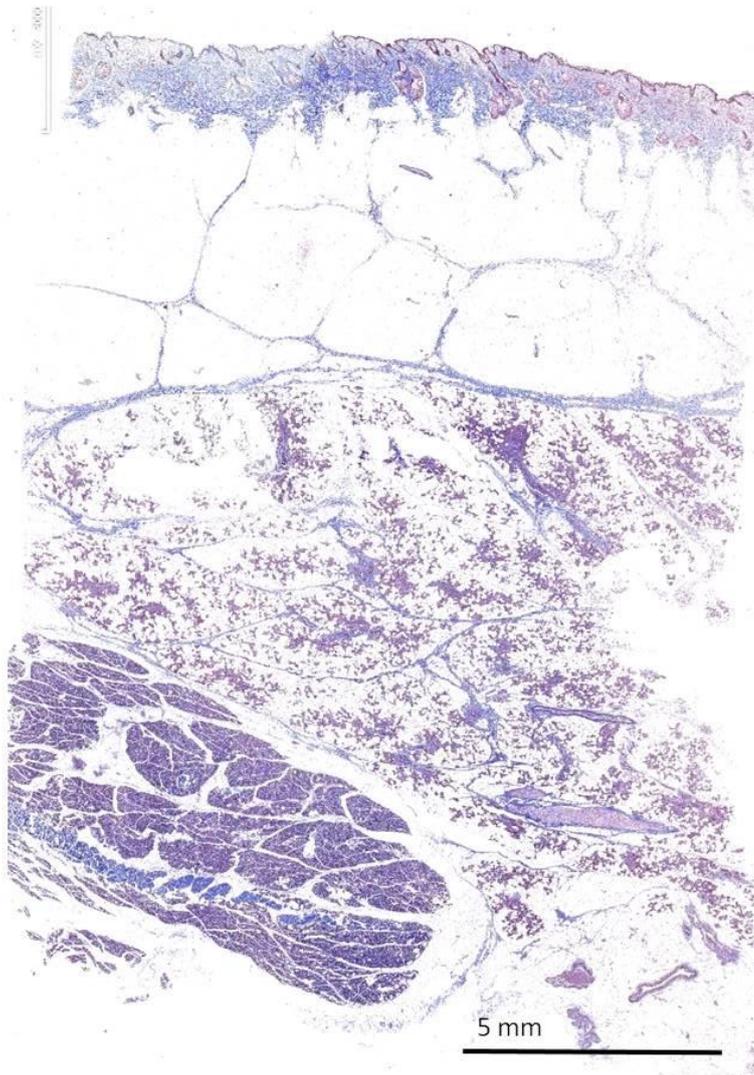


Figura 5.25.- Cara – segmento 5. Tricrómico de Masson

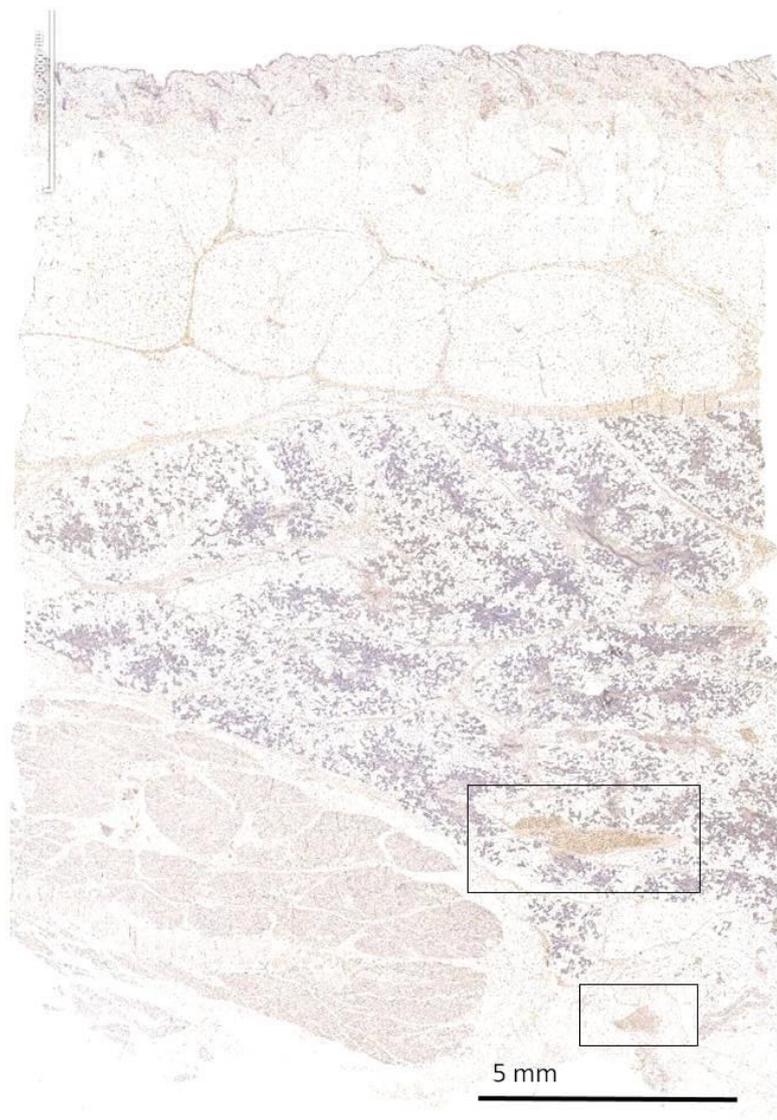


Figura 5.26.- Cara – segmento 5. Detección inmunohistoquímica de S100P

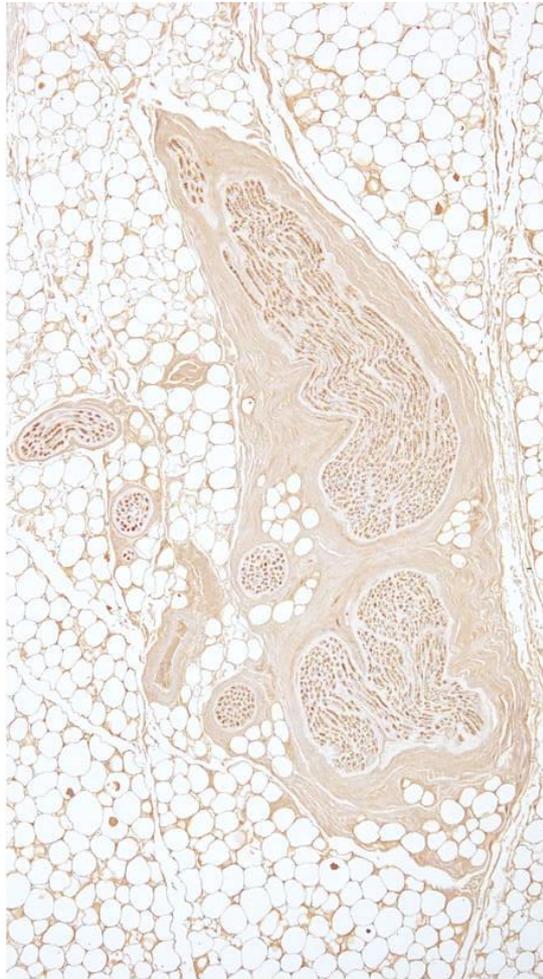


Figura 5.27. - Cara – segmento 5. Detección inmunohistoquímica de S100P. Detalle de la figura anterior

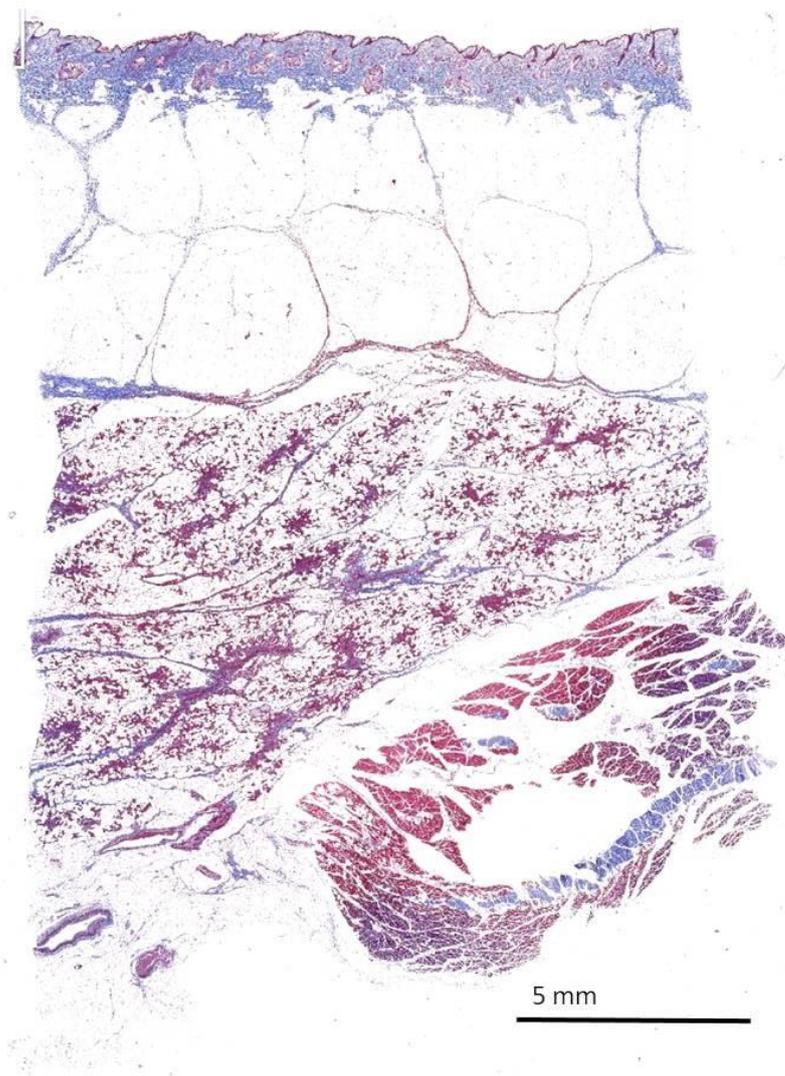


Figura 5.28.- Cara – segmento 5. Tricrômico de Masson

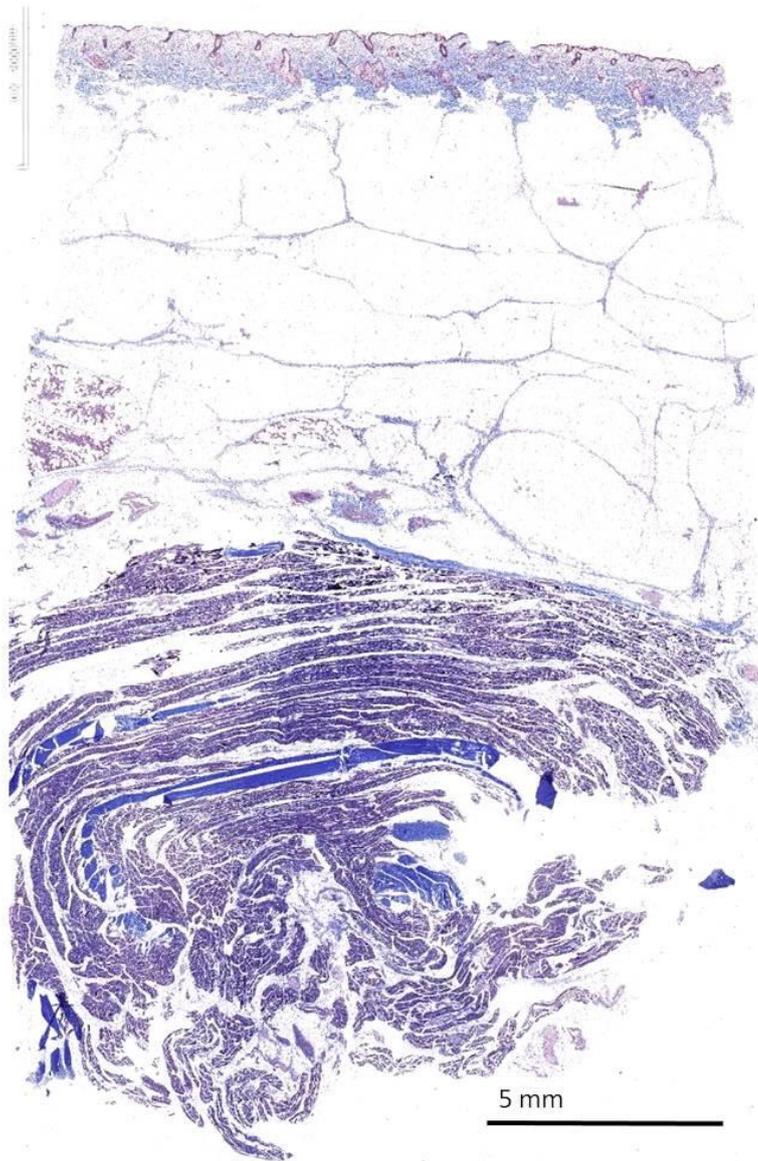


Figura 5.29.- Cara – segmento 6. Tricrómico de Masson

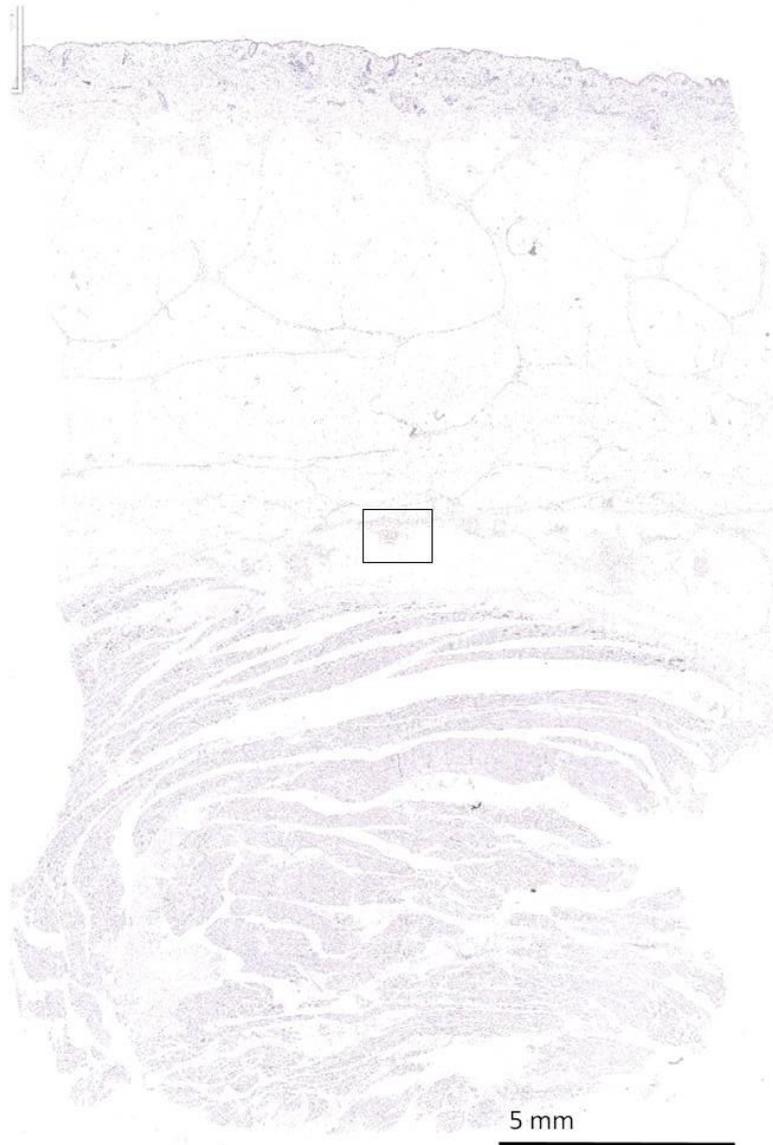


Figura 5.30.- Cara – segmento 5. Detección inmunohistoquímica de NFP

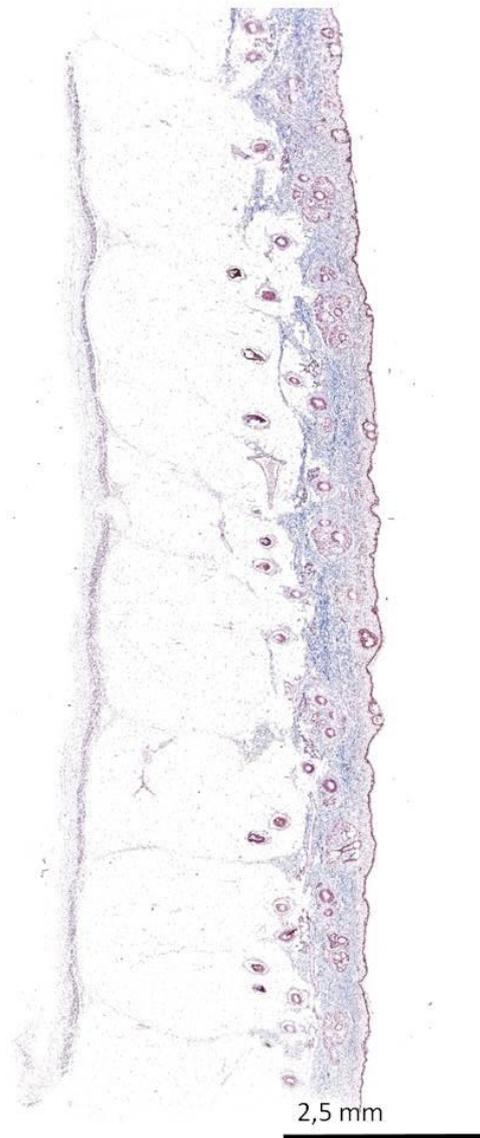


Figura 5.31.- Cara – segmento 7. Tricrómico de Masson



Figura 5.32.- Cara – segmento 7. Detección inmunohistoquímica de S100P

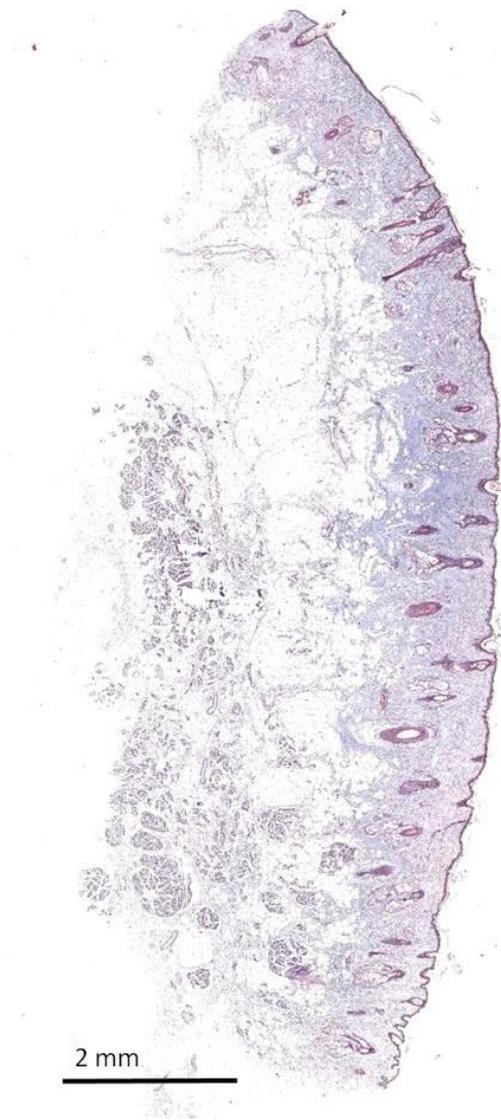


Figura 5.33.- Cara – segmento 8, 1/3 externo. Tricrómico de Masson



Figura 5.34.- Cara-segmento 8. 1/3 externo. Deteccion inmunohistoquímica de NFP

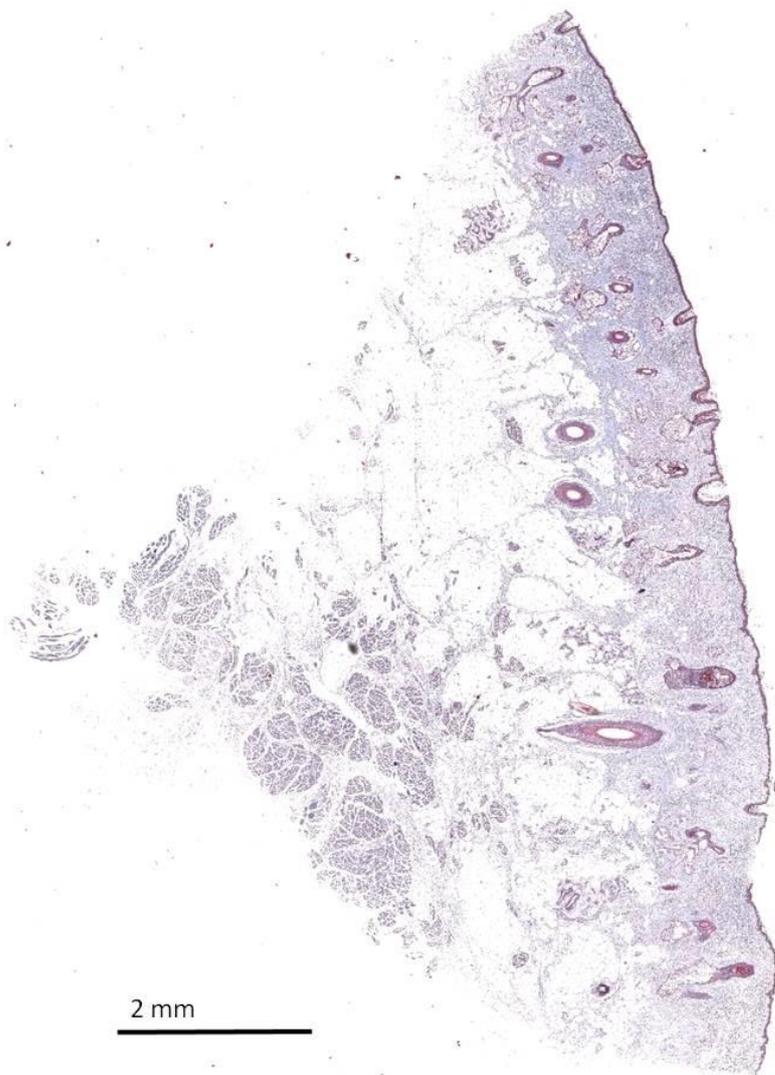


Figura 5.35.- Cara – segmento 8, 1/3 interno. Tricrómico de Masson



Figura 5.36.- Cara – segmento 8, 1/3 interno. Detección inmunohistoquímica de NFP

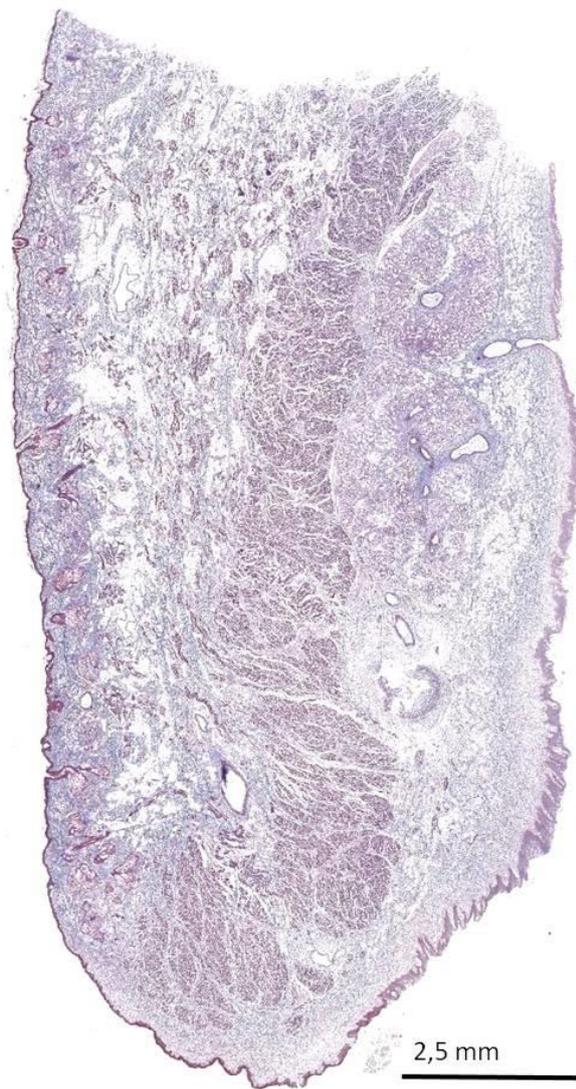


Figura 5.37.- Cara – segmento 9. Tricrómico de Masson

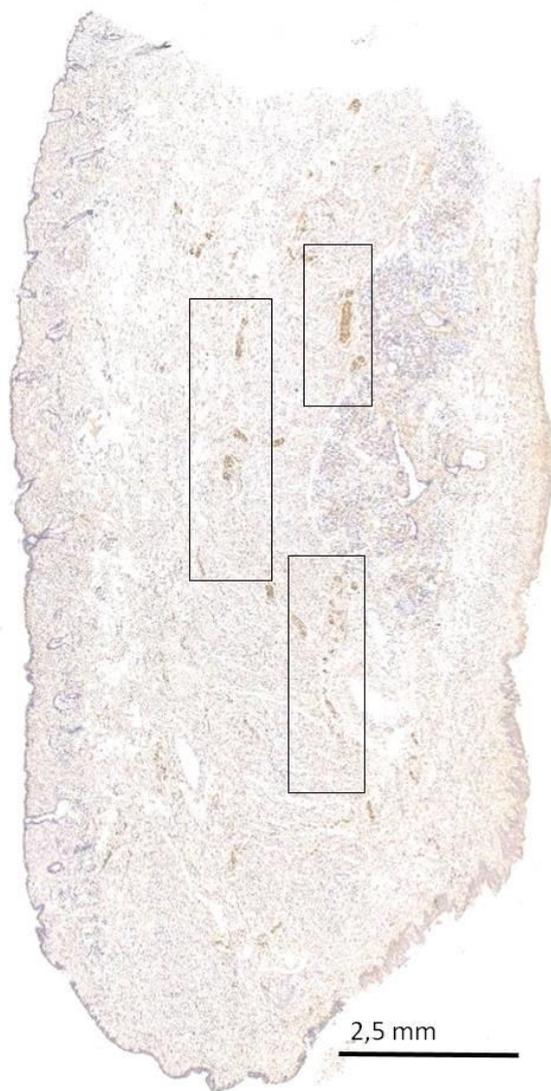


Figura 5.38.- Cara – segmento 9. Detección inmunohistoquímica de S100P

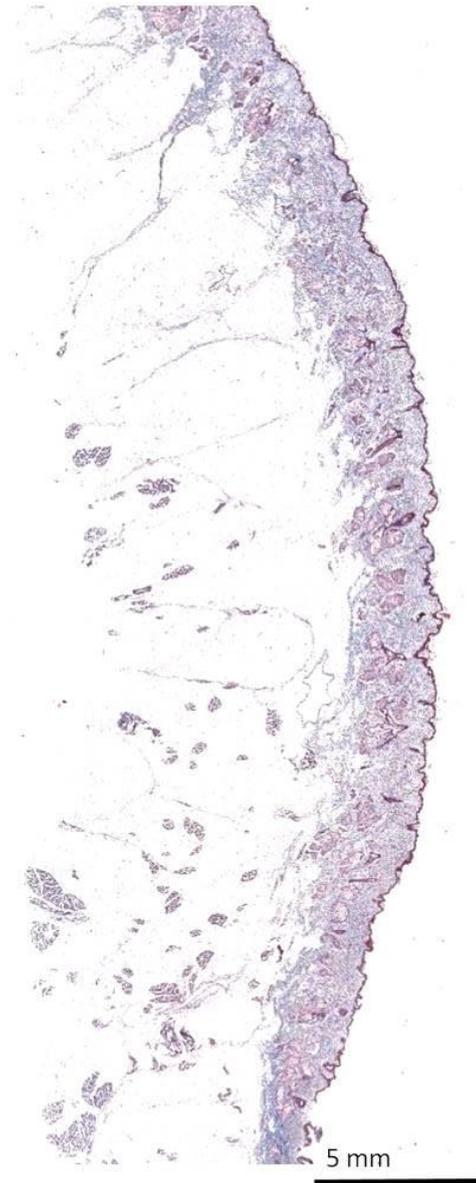


Figura 5.39.- Cara – segmento 10. Tricrómico de Masson



Figura 5.40.- Cara – segmento 10. Detección inmunohistoquímica de S100P

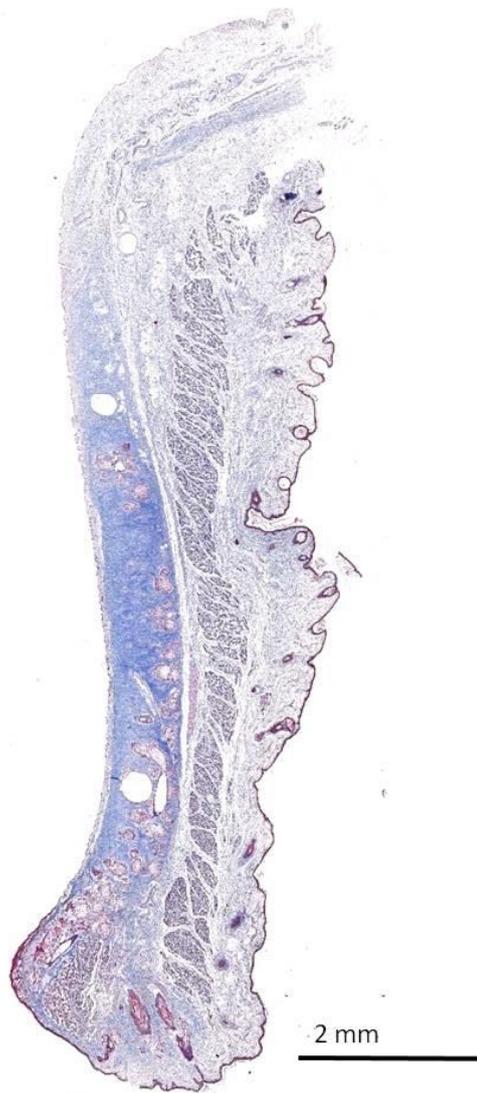


Figura 5.41.- Cara – segmento 11. Tricrómico de Masson

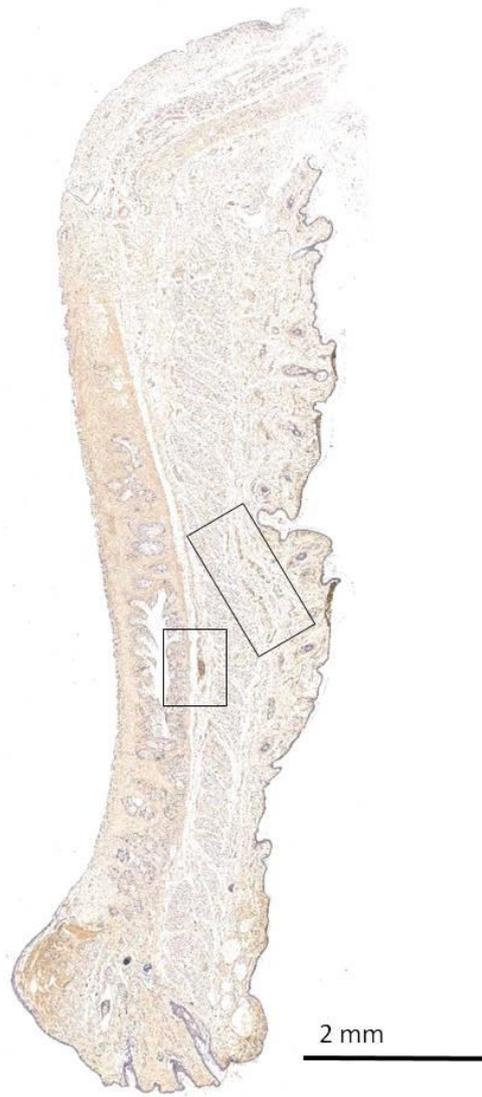


Figura 5.42.- Cara – segmento 11. Detección inmunohistoquímica de S100P

En todas las regiones faciales se procedió a la medición del espesor de las diferentes capas y de los parámetros que se incluyen en el estudio de Macchi et al. (2010). En 10 secciones por cada una de las regiones preestablecidas, se realizaron las mediciones sobre 5 secciones, separadas 1mm entre ellas. Debe de hacerse notar las grandes variaciones en los valores obtenidos ya que algunos tabiques, especialmente los perpendiculares a la superficie de la piel, referidos aquí como verticales, presentan valores muy diferentes según la altura a la que se realizó la medición (**Figuras 5.43 y 5.44**).

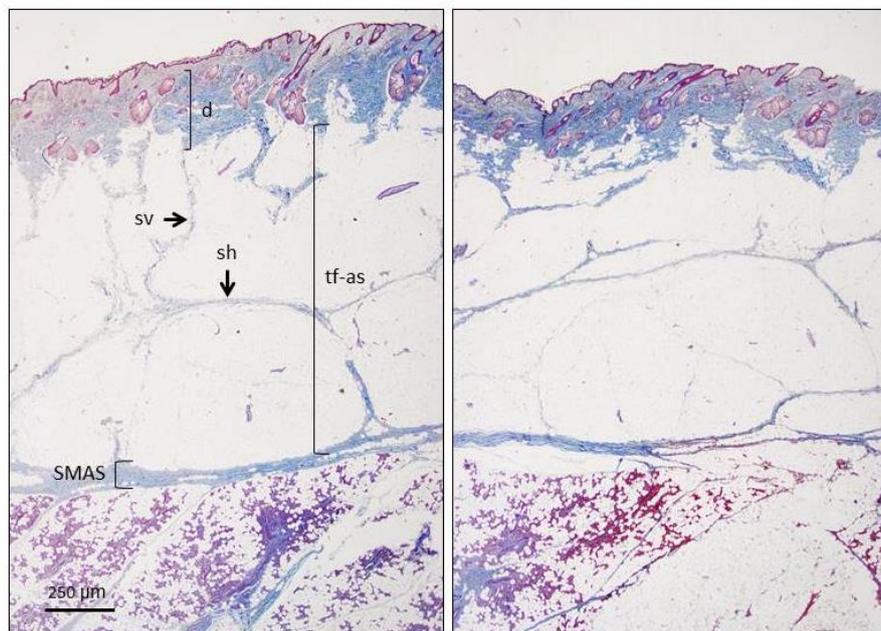


Figura 5.43.- Corte perpendicular de la cara correspondiente a la zona 5. d: dermis, sh: septos horizontales, sv: septos verticales, tf-as: tejido fibroadiposo superficial. SMAS: sistema musculoaponeurótico superficial.

Otro de las características cutáneas consideradas ha sido el tamaño de los nódulos de grasa cutánea, superficial y profunda. Las diferencias fueron muy evidentes entre las diferentes regiones, alcanzando los máximos tamaños en las regiones del surco nasolabial, bucal y de la mejilla, las mínimas en las cejas. No se observaron nódulos de grasa continuos en el labio superior ni en el párpado superior. Aunque la irregularidad de los nódulos y las divisiones totales y/o parciales por los septos de tejido conectivo no consienten hacer un estudio morfométrico, aparentemente fueron de mayor tamaño en las mujeres que en los hombres, estaban en relación con el estado nutricional aparente de los sujetos y fueron de mayor tamaño en el estrato fibroadiposo superficial que en el profundo (**Figura 5.45**). Entre los adipocitos se encuentran vasos sanguíneos de diferentes calibres y nervios de diferentes diámetros (**Figura 5.45**).

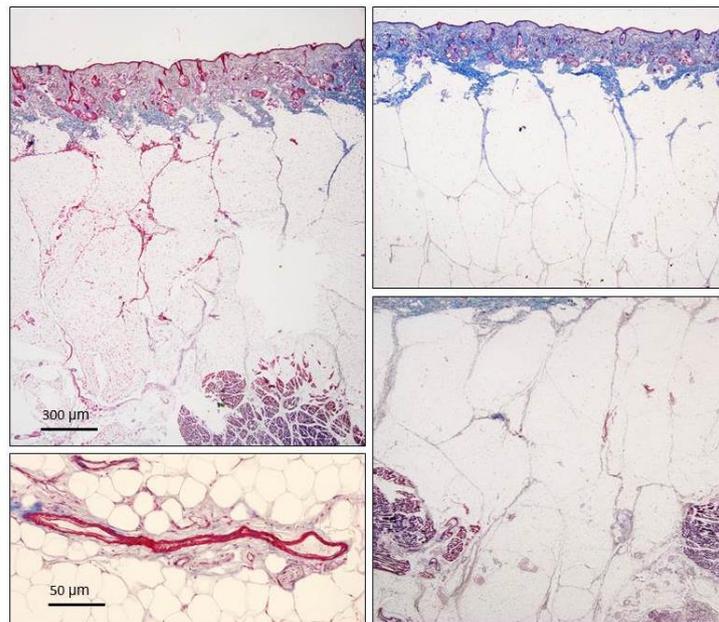


Figura 5.44.- Corte perpendicular de la cara correspondiente a las zonas 4 y 5. En el espesor de los septos se encuentran vasos sanguíneos de diferentes calibres y nervios.

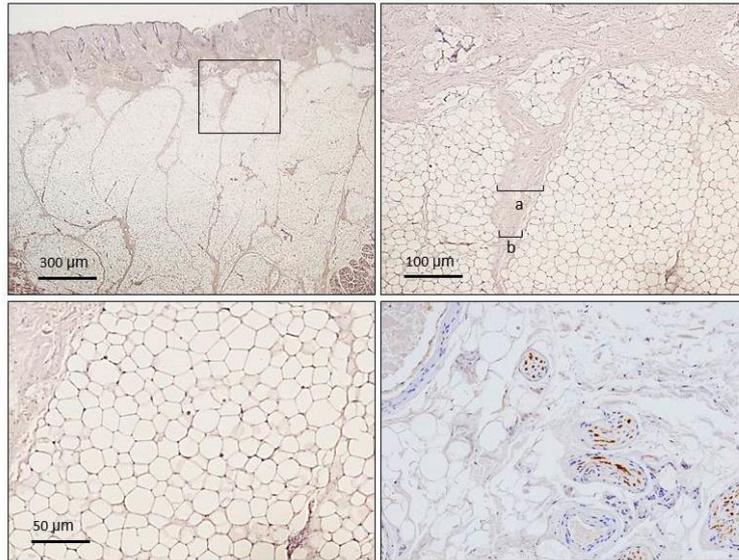
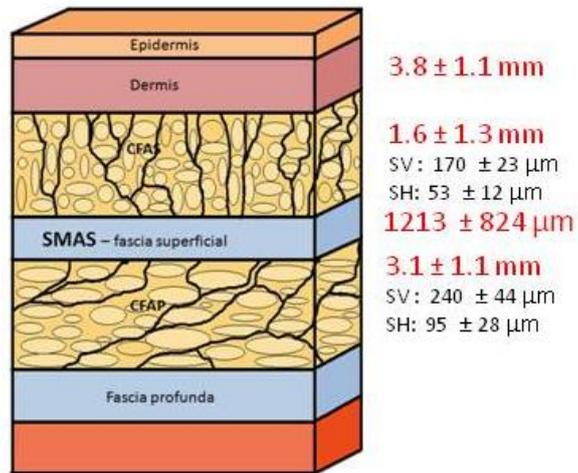


Figura 5.45.- Corte perpendicular de la cara correspondiente a las zonas 3 y 4. El espesor de los septos verticales varía con la profundidad (a y b en la imagen superior derecha), el tamaño de los adipocitos es muy variable y entre ellos se encuentran vasos sanguíneos y nervios.

Los resultados del estudio cuantitativo, se realiza de una forma gráfica en la **figura 5.46.**

En las zonas correspondientes al surco nasolabial y bucal (**Figura 5.46A**) la dermis y la capa fibroadiposa profunda fueron las más gruesas, y el SMAS fue claramente identificable, aunque su espesor fue variable dentro de ella.

Zonas 1 y 2



Zonas 3 y 4

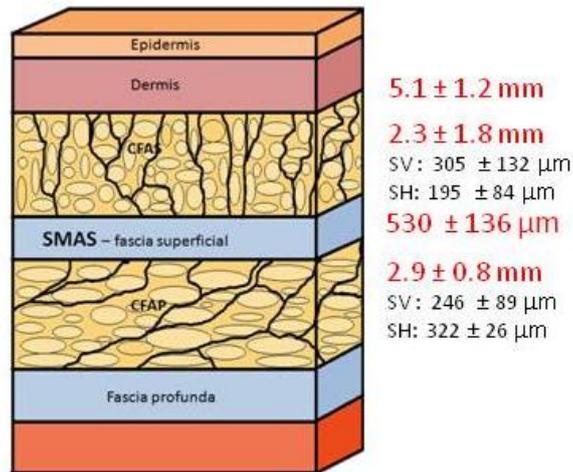
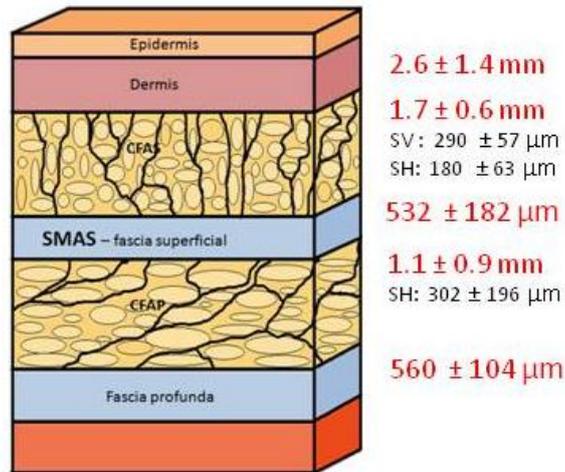


Figura 5.46A.- Espesor relativo de los estratos histológicos de las paredes de la cara en las regiones del surco nasolabial y bucal.

Zonas 5 y 6



Zona 7

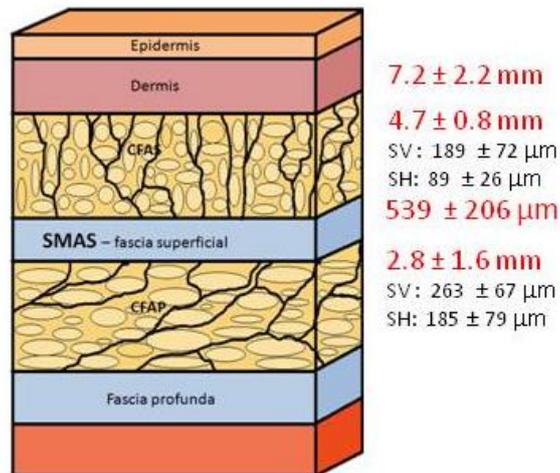


Figura 5.46B.- Espesor relativo de los estratos histológicos de las paredes de la cara en las regiones del surco masetérico-parotídea y temporal.

En la zona masetérico-parotídea las dos aponeurosis, superficial y profunda, se pueden identificar con claridad, con grosores semejantes; por otro lado, los estratos fibroadiposos superficiales y profundo tienen un grosor parecido (**Figura 5.46B**).

En la zona de la ceja, aunque con leves variaciones entre los segmentos interno y externo, no fue identificable un SMAS, y sólo pudo valorarse el espesor de la dermis y de la grasa subcutánea. El grosor de los tabiques en esta zona de piel

fue semejante al de otras regiones de la cara (**Figura 5.46C**; superior). Una situación semejante se observó en la zona del mentón (**Figura 5.46C**; inferior).

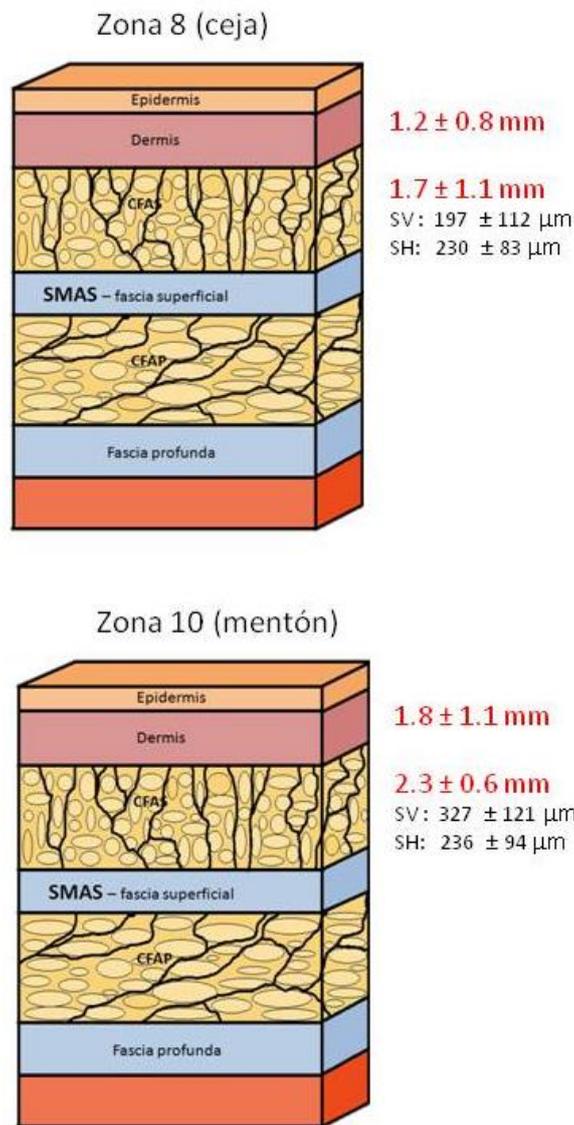


Figura 5.46C.- Espesor relativo de los estratos histológicos de las paredes de la cara en las regiones de la ceja (superior) y mentón (inferior).

5.2.2. Identificación microscópica de los nervios en la cara

La identificación de los perfiles nerviosos en los diferentes segmentos faciales estudiados se basó en criterios morfológicos y de inmunohistoquímica. Mediante las técnicas estructurales de hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson los nervios se identifican como estructuras redondeadas o alargadas, rodeadas por una capa de tejido conectivo denso (epineuro) que presentan

tabiques que los compartimentalizan (perineuro) con vasos sanguíneos en su interior (**Figuras 5. 47 y 5.48**).

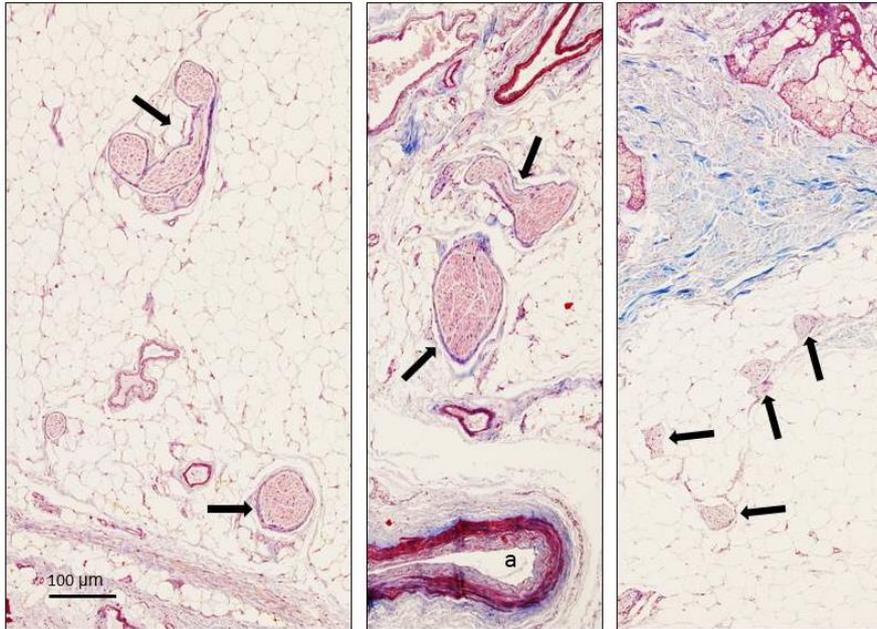


Figura 5.47.- Perfiles nerviosos (flechas) en diferentes planos de las regiones de la cara analizadas. Se pueden identificar en las capas de tejido fibroadiposo, en localizaciones perivasculares profundas o como pequeños nervios por debajo del corion.

Por las características del material utilizado en el estudio, que había estado sometido a largos periodos de fijación, en ocasiones el grado de tinción que se consigue no es el idóneo, lográndose tinciones muy pálidas de los nervios pero que a pesar de ello consienten su identificación (**Figura 5.48**).

Con las técnicas de inmunohistoquímica utilizadas para marcar de forma selectiva los diferentes componentes de las fibras nerviosas (axones y células de Schwann) las identificaciones de los perfiles nerviosos fueron mucho más claras y constantes; además consienten localizar pequeños nervios que serían difíciles de ver con las técnicas estructurales habituales (**Figura 5.49**).

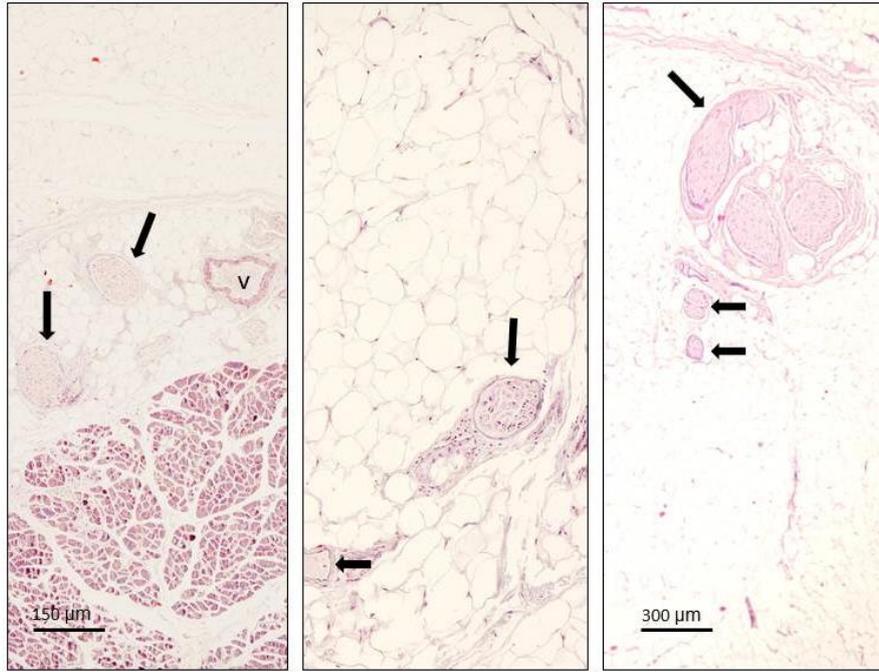


Figura 5.48.- Perfiles nerviosos (flechas) en diferentes planos de las regiones de la cara analizadas.

Además de esa notable ventaja, el estudio de secciones seriadas consiente obtener diferentes aspectos de las mismas estructuras y diferenciar de manera clara los diferentes componentes nerviosos.

Para identificar el perfil inmunohistoquímico exacto dentro de un perfil nervioso, se han utilizado dos estrategias: estudio de cortes seriados y realización de doble inmunofluorescencia. Mediante el primer método, por exclusión se puede determinar cuántas fibras nerviosas expresan una determinada proteína (por comparación con la totalidad de las fibras; **Figuras 5.50 y 5.51**) y con la segunda establecer la presencia de una proteína dada en el axón o en las células de Schwann (**Figuras 5.52 y 5.53**).

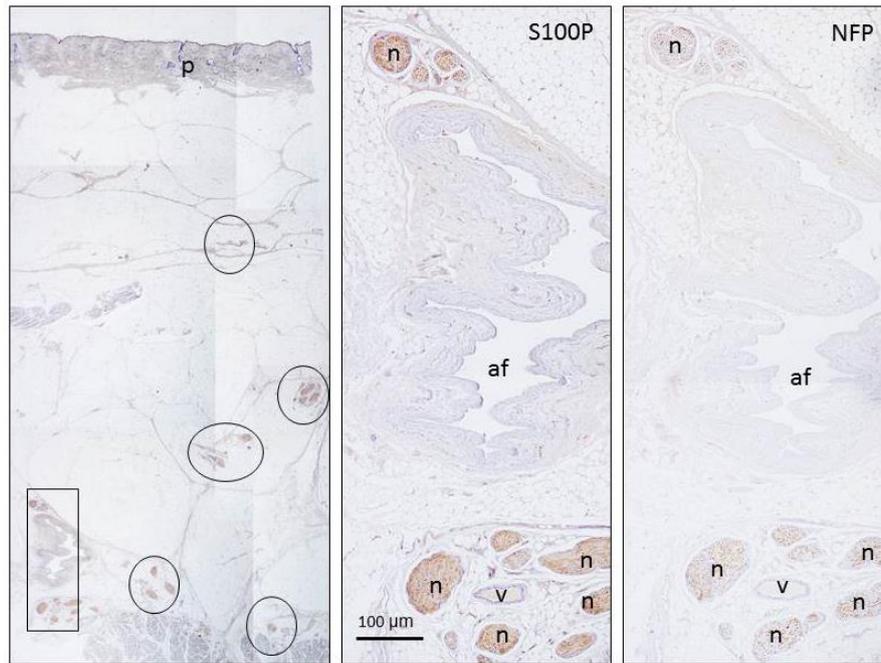


Figura 5.49.- Imagen histológica procesada para la detección inmunohistoquímica de la proteína S100 o el NFP. Esta técnica consiente la fácil localización topográfica de los perfiles nerviosos, independientemente de su tamaño. Además, cuando se estudias los cortes en detalle se pueden apreciar los diferentes componentes de los nervios. Los círculos en la imagen de la izquierda encierran perfiles nerviosos de diferentes tamaños. Las imágenes central y derecha son secciones seriadas que corresponden al rectángulo de la figura izquierda, y han sido procesadas para la detección de la proteína S100 y el NFP, respectivamente. af: arteria facial; n: nervio; p: piel; v: vaso sanguíneo.

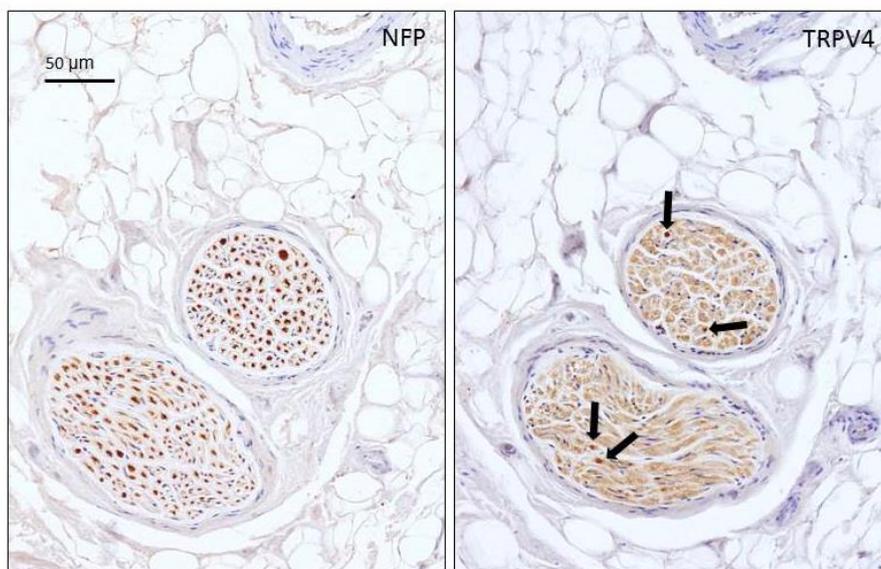


Figura 5.50. – Cortes seriados de dos perfiles nerviosos mostrando como sólo algunas fibras (flechas) expresan TRPV4, mientras que todos los axones son positivas para el NFP.

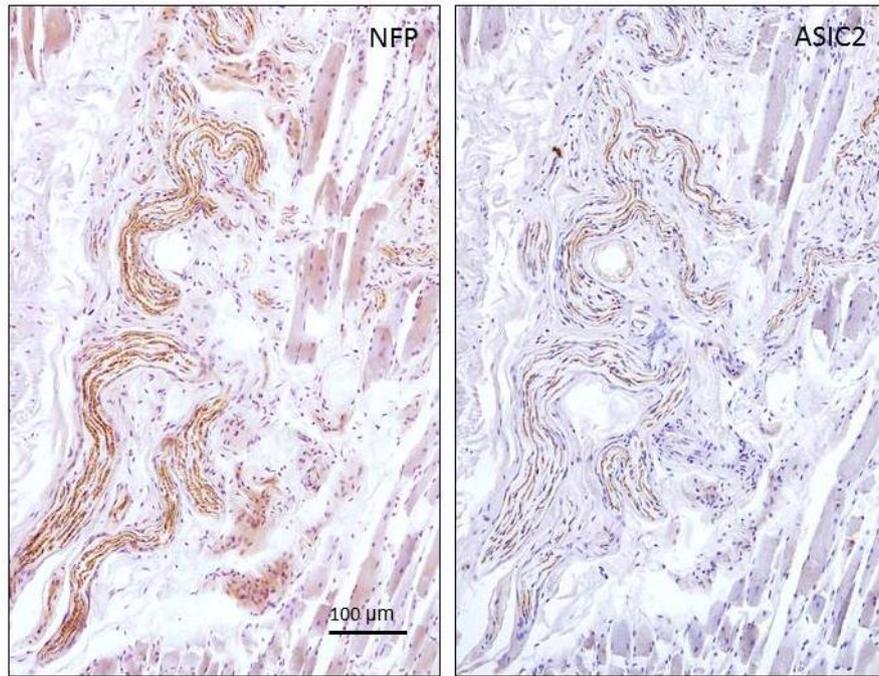


Figura 5.51. - Cortes seriados de dos perfiles nerviosos mostrando como sólo algunas fibras (flechas) expresan ASIC2, mientras que todos los axones son positivos para el NFP.

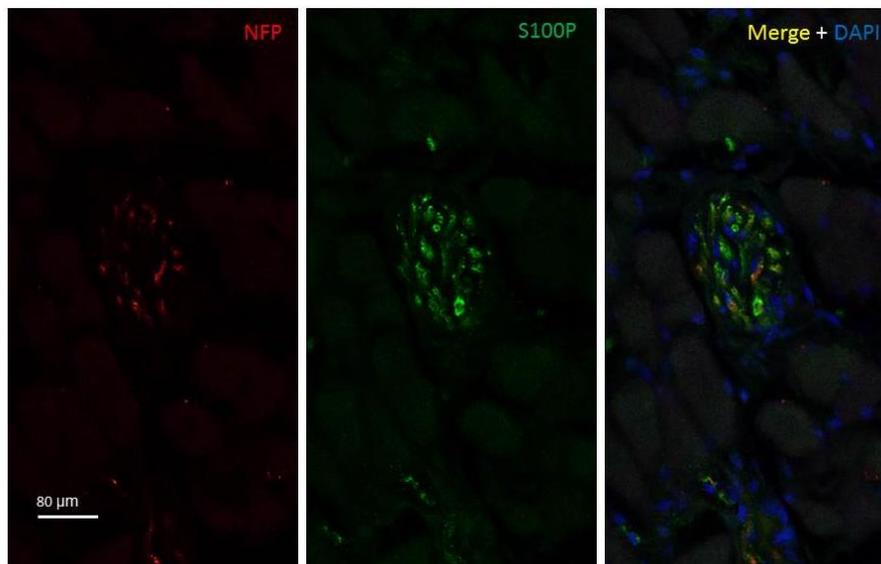


Figura 5.52.- Doble inmunofluorescencia en una sección de un nervio situado en el tejido fibroadiposo profundo de la mejilla. La inmunorreacción para el NFN (fluorescencia roja) y la proteína S100 (fluorescencia verde) aparecen segregadas. Los núcleos de las células presentes en la sección aparecen en color azul por la coloración con DAPI.

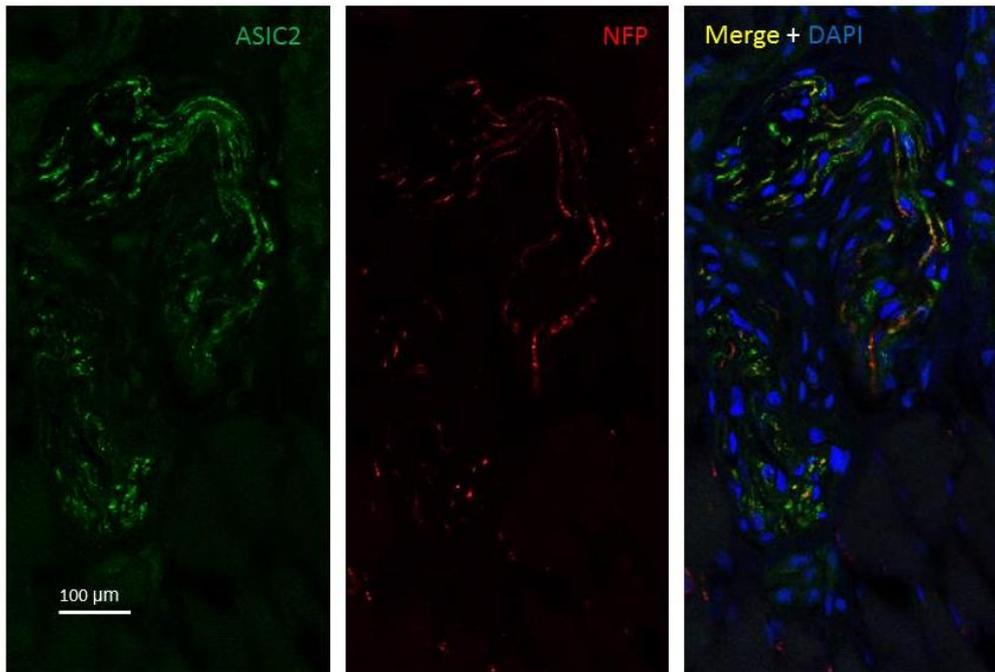


Figura 5.53. - Doble inmunofluorescencia en una sección de un nervio situado en el perimio del músculo bucal. La inmunorreacción para el NFN (fluorescencia roja) y el ASIC2 (fluorescencia verde) aparecen segregadas en algunas fibras nerviosas y parcialmente co-localizadas. Los núcleos de las células presentes en la sección aparecen en color azul por la coloración con DAPI.

En los estratos fibroadiposos de la cara, y por debajo de la aponeurosis profunda en algunas regiones, se encuentran numerosos perfiles nerviosos. Las densidades de perfiles nerviosos en cada una de las capas y la distribución por calibres de los mismos se recogen en la **Tabla 5.2**.

En las zonas 1 a 6 se han detectado perfiles nerviosos en todos los planos de la cara y en esos mismos se han encontrado nervios de diferentes calibres asociados con el SMAS, bien localizados dentro de él o adosados a las caras superficial o profunda. Cabe destacar que ocasionalmente se han observado nervios de diámetro grande en el estrato fibroadiposo superficial, a veces en grandes densidades (por ejemplo ver Figura 5.10) que seguramente corresponden a zonas de unión entre los nervios facial y trigémino (en esta zona las uniones entre los nervios infraorbitario y zigomático).

En las regiones correspondientes a la ceja y el mentón sólo se encontraron perfiles nerviosos en el estrato fibroadiposo superficial y entre las fibras musculares de las fibras situadas en la región.

Zona	CFAS	CFSP	SMAS	Profundos
1-2	< 25 μm 15 \pm 4 26 – 100 μm 31 \pm 8 > 101 μm 9 \pm 5	< 25 μm 26 – 100 μm 9 \pm 3 > 101 μm	< 25 μm 5 \pm 2 26 – 100 μm > 101 μm	< 25 μm 26 – 100 μm 22 \pm 6 > 101 μm 3
3-4	< 25 μm 12 \pm 5 26 – 100 μm 3 > 101 μm	< 25 μm 23 \pm 9 26 – 100 μm 19 \pm 8 > 101 μm 11 \pm 4	< 25 μm 26 – 100 μm 21 \pm 5 > 101 μm	< 25 μm 26 – 100 μm 12 \pm 6 > 101 μm 35 \pm 10
5-6	< 25 μm 23 \pm 8 26 – 100 μm > 101 μm	< 25 μm 8 \pm 3 26 – 100 μm > 101 μm 9 \pm 2	< 25 μm 16 \pm 9 26 – 100 μm 4 \pm 2 > 101 μm	< 25 μm 26 – 100 μm 6 \pm 2 > 101 μm 13 11 \pm 4
7	< 25 μm 26 – 100 μm 5 \pm 3 > 101 μm	< 25 μm 26 – 100 μm > 101 μm	< 25 μm 26 – 100 μm > 101 μm	< 25 μm 26 – 100 μm 8 \pm 2 > 101 μm
8	< 25 μm 14 \pm 6 26 – 100 μm 3 > 101 μm	< 25 μm 26 – 100 μm > 101 μm	< 25 μm 26 – 100 μm > 101 μm	< 25 μm 26 – 100 μm 8 \pm 2 > 101 μm
10	< 25 μm 21 \pm 5 26 – 100 μm 4 \pm 2 > 101 μm	< 25 μm 26 – 100 μm > 101 μm	< 25 μm 26 – 100 μm > 101 μm	< 25 μm 26 – 100 μm 11 \pm 7 > 101 μm

Tabla 5.1.- Distribución por diámetros de los perfiles nerviosos presentes en las regiones de la cara en las que se observa estratificación histológica. Los números en rojos corresponden a los valores de la media \pm la desviación estándar.

Para la identificación de las estructuras nerviosas sensitivas en las diferentes regiones de la cara estudiadas, se han utilizado criterios semejantes a los comentados para los nervios. No obstante, en el espesor del perimisiso estas formaciones pueden resultar difíciles de identificar (**Figura 5.54, izquierda**) aunque las técnicas de inmunohistoquímica para la detección de elementos nerviosos facilitan la misma (**Figura 5.54, derecha**). No obstante, la localización es más precisa cuando no se contrastan las imágenes procesadas para la detección de antígenos nerviosos.

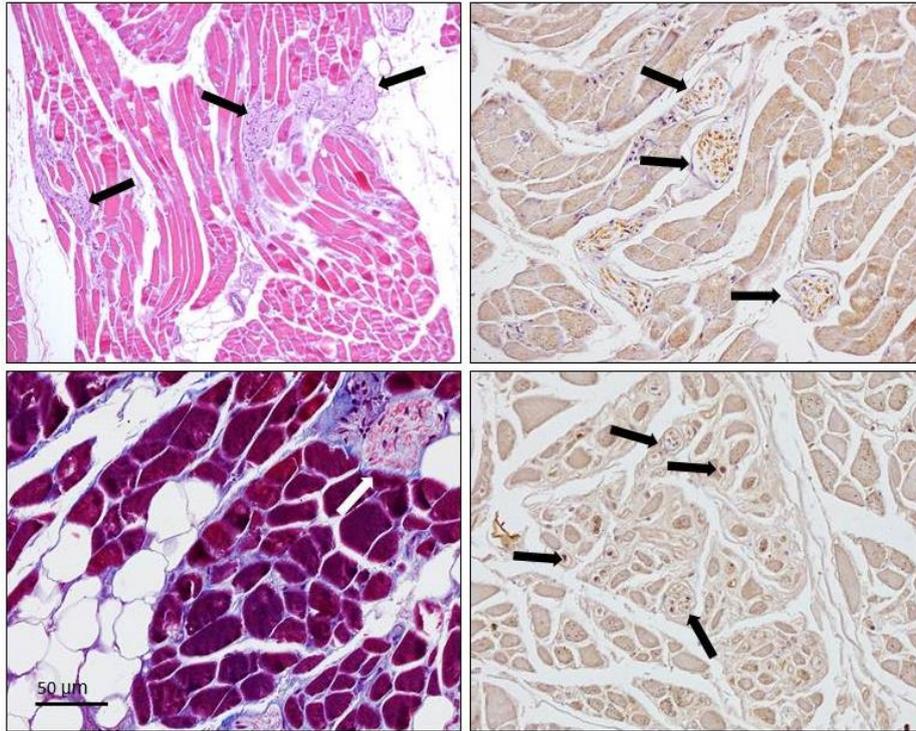


Figura 5.54. – Perfiles de formaciones nerviosas sensitivas (flechas) en los músculos bucal (superior izquierda) y masetero (inferior izquierda) identificados mediante la técnica del tricrómico de Masson y por la inmunorreacción positiva para el NFP (superior e inferior derecha).

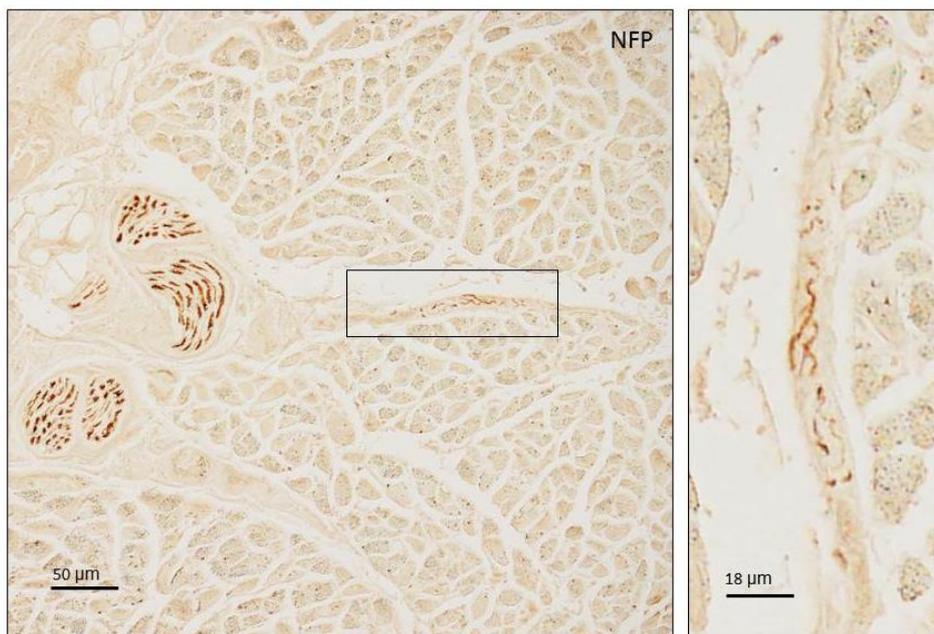


Figura 5.55. - Perfiles de nervios y de de formaciones nerviosas sensitivas (rectángulo y detalle de la mitad derecha de la imagen) en el músculo bucal identificados por la inmunorreacción positiva para el NFP (superior e inferior derecha). Las formaciones nerviosas aparecen como formaciones capsuladas dentro del epimisio y perimisio.

5.2.3. Distribución regional de los nervios de la cara

5.2.3.1.- *Mejilla, surco nasolabial y bucal.* En la mejilla los nervios se localizan en todos los estratos histológicos de la pared de la cara. La distribución general de los perfiles nerviosos se aprecia en la **figura 5.46**, y con en las **figuras 5.56 a 5.58**. Los nervios de mayor calibre se encuentran en las capas fibroadiposa profunda y en relación con las fibras musculares del músculo bucal, formando en algunos casos troncos nerviosos gruesos formados por varios fascículos (**Figura 5.56**). En conjunto predominan los nervios de diámetro medio en todos los estratos (salvo el fibroadiposo superficial) y solo en los estratos fibroadiposos se han identificado nervios de pequeño diámetro.

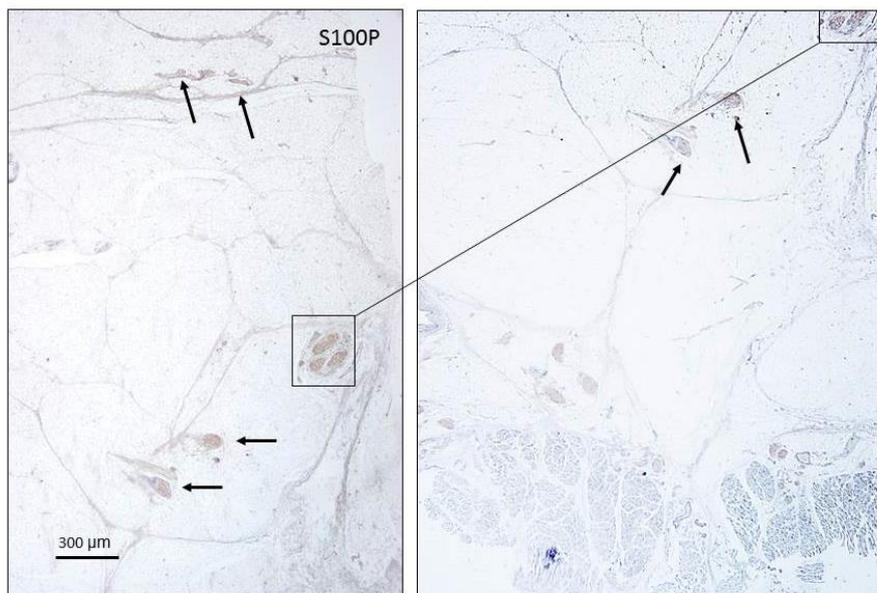


Figura 5.56.- Perfiles nerviosos (flechas) en región de la mejilla.

Los nervios de diámetro intermedio y grande se asocian casi siempre a vasos sanguíneos y por sus características inmunohistoquímicas están formados preferentemente por fibras mielínicas (**Figura 5.58**). En esta región de la cara también se han encontrado nervios entre las fibras musculares de los músculos bucal y zigomático mayor y menor, casi mostrando perfiles de secciones longitudinales y transversales en el perimisiso (**Figura 5.57**).

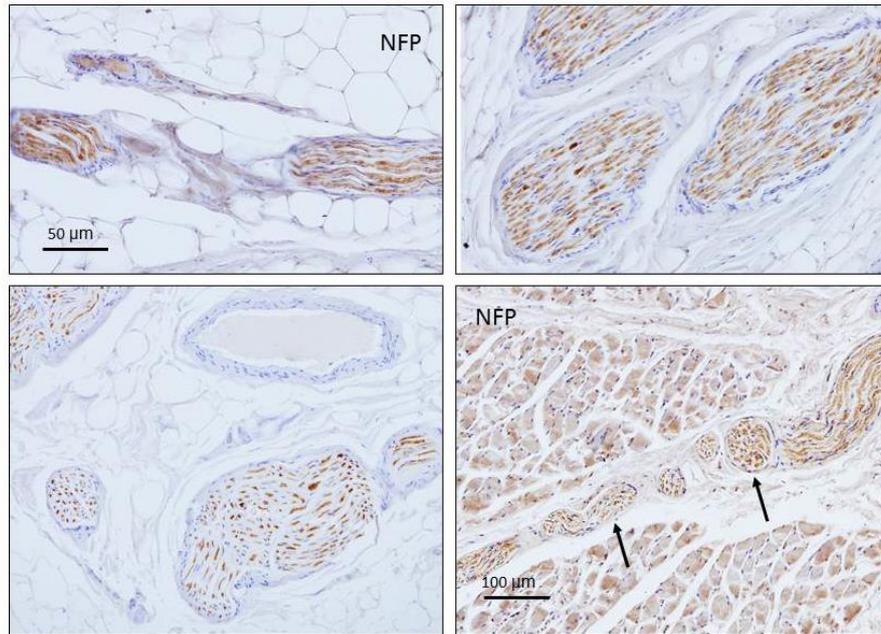


Figura 5.57.- Perfiles nerviosos (flechas) en diferentes planos de la mejilla

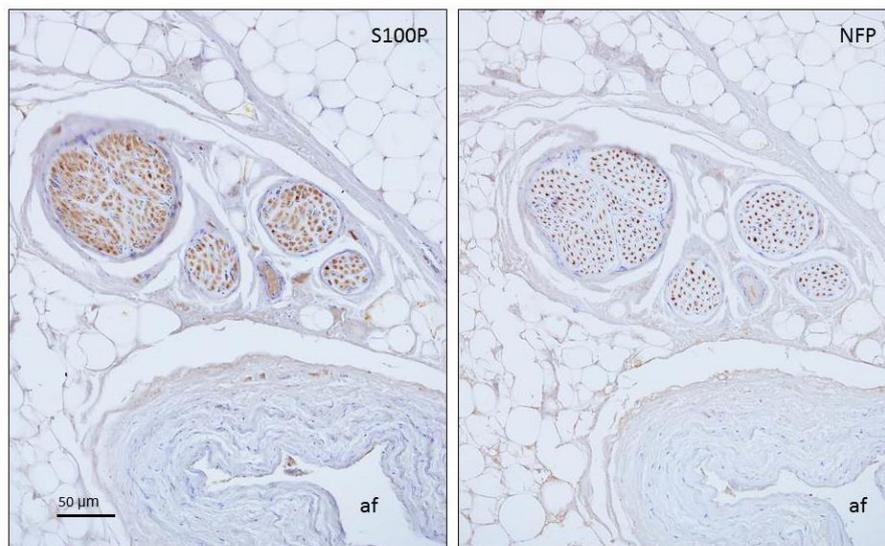


Figura 5.58.- Perfiles nerviosos en la mejilla. El patrón de distribución de la inmunorreacción para la proteína S100 y el NFP muestra que la mayoría de las fibras son mielínicas.

La distribución de los nervios en las zonas correspondientes al surco nasolabial y perioral es muy semejante al descrito para la región de la mejilla, pero la densidad de nervios de diámetro grande es menor, aunque como en aquella estos solo se encuentran con relación a los músculos y en el estrato fibroadiposo profundo (**ver figura 5.11**). Los nervios de menor diámetro están en el plano adiposo superficial y en el SMAS, y los de tamaño intermedio todas

las capas menos el SMAS, siendo más abundantes en el estrato fibroadiposo superficial (**ver Tabla 5.2**).

5.2.3.2.- **Región masetérico-partotídea**.- En el estrato fibroadiposo superficial solo se han encontrado perfiles nerviosos de pequeño diámetro, mientras que en el estrato fibroadiposo profundo los nervios pequeños son escasos y también hay nervios de gran diámetro. Pero las mayores densidades de nervios se encuentran en relación directa con el SMAS y los músculos; en relación al SMAS hay nervios de diámetros pequeño y mediano y en relación con los músculos de diámetros intermedio y grande (**ver figuras 5.24, 5.26 y 5.27**).

5.2.3.3.- **Región temporal**.- Los perfiles nerviosos, detectados con los diferentes marcadores generales, se encuentran a nivel del SMAS, en íntimo contacto con el tejido conectivo que rodea los fascículos musculares del músculo temporal. Ocasionalmente también hay pequeños fascículos nerviosos en la zona profunda del tejido fibroadiposo superficial (**Figura 5.59**). Se trata en todos los casos de perfiles nerviosos de tamaño intermedio.

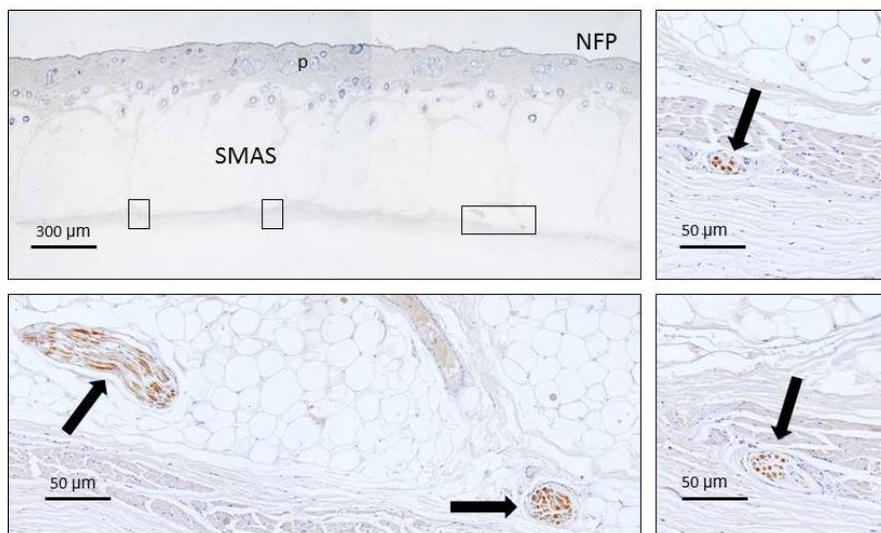


Figura 5.59.- Perfiles nerviosos (flechas) en la región temporal.

5.2.3.4.- **Mentón**.- En la región mentoniana los septos fibrosos verticales alcanzan hasta el periostio, y los perfiles nerviosos se disponen en las zonas medias del tejido fibroadiposo superficial (**Figura 5.60**). La mayoría de los

perfiles nerviosos contactan con la cara profunda de la dermis y terminan penetrando en ella. El diámetro de los nervios corresponde a los de tamaño pequeño y mediano. Ocasionalmente establecen contacto con formaciones bulbares de pelos y glándulas sebáceas (**Figura 5.61**), pero en ningún caso se han encontrado perfiles nerviosos centro de la epidermis ni organizaciones de las fibras nerviosas que sugieran la existencia de corpúsculos sensitivos.

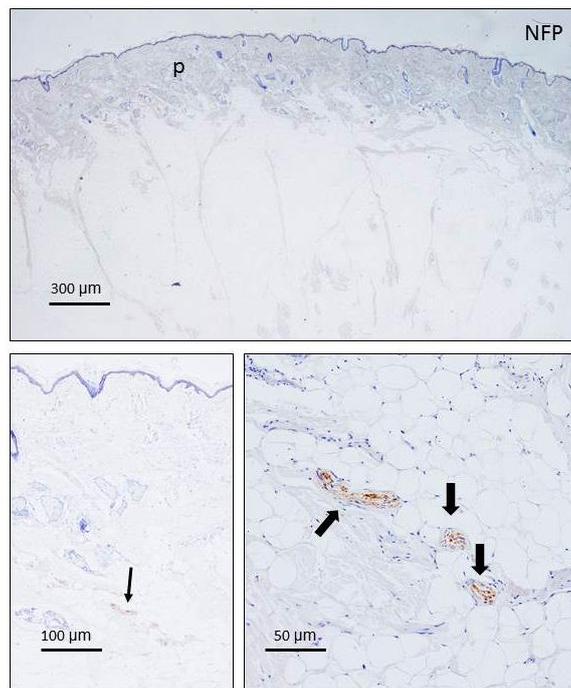


Figura 5.60.- Perfiles nerviosos (flechas) en los diferentes planos histológicos de la piel del mentón.

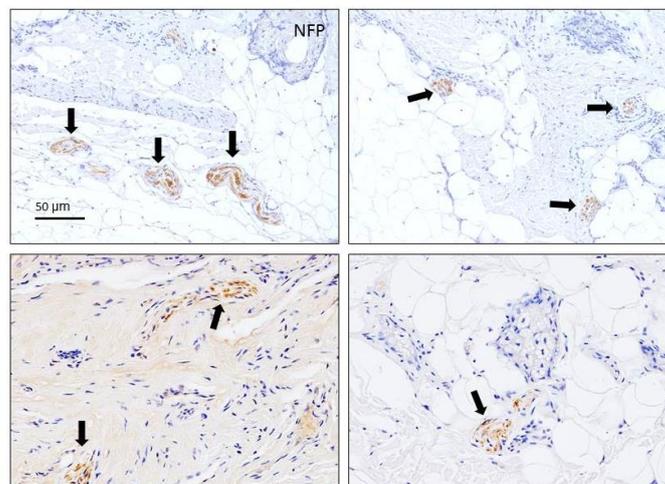


Figura 5.61.- Perfiles nerviosos (flechas) en los diferentes planos histológicos de la piel del mentón.

5.2.3.5.- *Labio superior*.- El patrón de inervación del labio superior se aleja de los descritos hasta ahora porque su estructura es diferentes a la del resto de las regiones de la cara comentadas. La densidad de perfiles nerviosos es muy alta y la mayoría de los nervios se disponen en las caras anterior y posterior de las fibras del orbicular de los labios. Teniendo en consideración que las secciones realizadas fueron perpendiculares al borde libre del labio, los nervios siguen un trayecto paralelo a este. En la división por diámetros establecida todos ellos corresponden a nervios de diámetro intermedio, y en su mayoría están formados por fibras mielínicas (**Figura 5.62**).

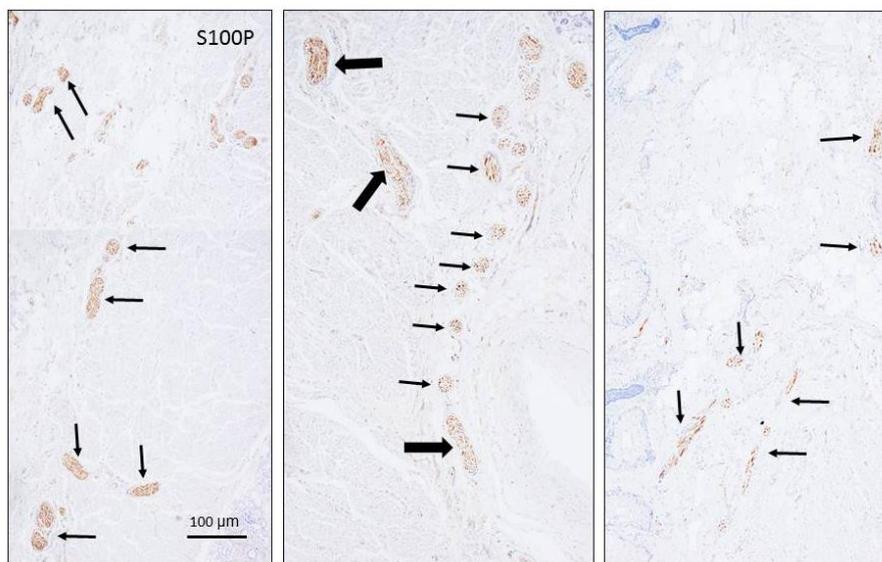


Figura 5.62.- Perfiles nerviosos (flechas) en el párpado superior

También se han encontrado numerosos perfiles nerviosos en relación con la dermis, el perimio del orbicular de los labios y los diferentes tipos de glándulas de la piel y de la mucosa labial (**Figuras 5.63 a 5.65**). Sin embargo en ningún caso se han detectado perfiles nerviosos en relación directa con los epitelios de revestimiento ni glandulares. En la dermis, además, se han observado formaciones que asemejan a corpúsculos de tipo Ruffini (**Figuras 5.64 y 5.65**). Pero en base exclusivamente a la morfología no se puede concluir si, efectivamente, se trata de estructuras sensitivas o son secciones oblicuas de

nervios. Sólo se han identificado con claridad corpúsculos de Meissner-like en la zona de transición piel mucosa, y se describirán en detalle más adelante.

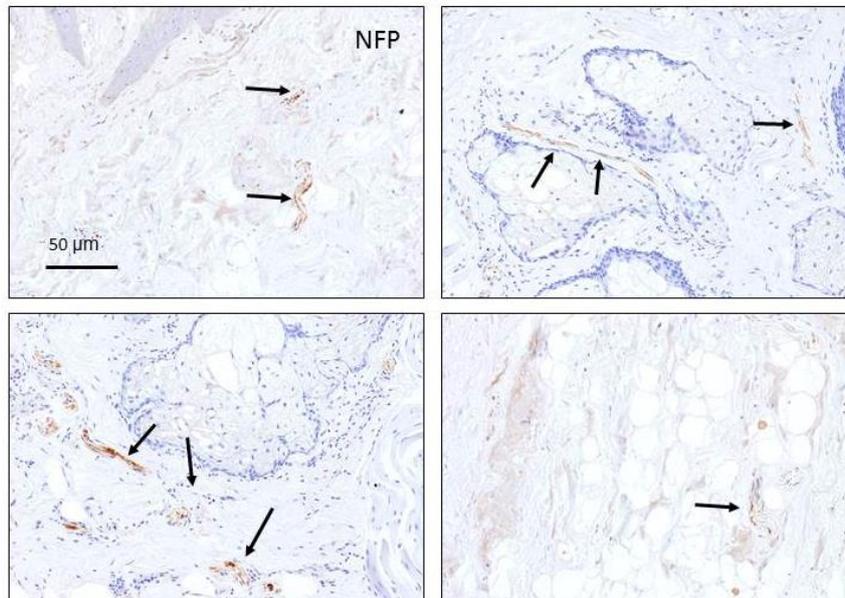


Figura 5.63.- Perfiles nerviosos (flechas) en la dermis del labio superior y en relación con las glándulas sudoríparas.

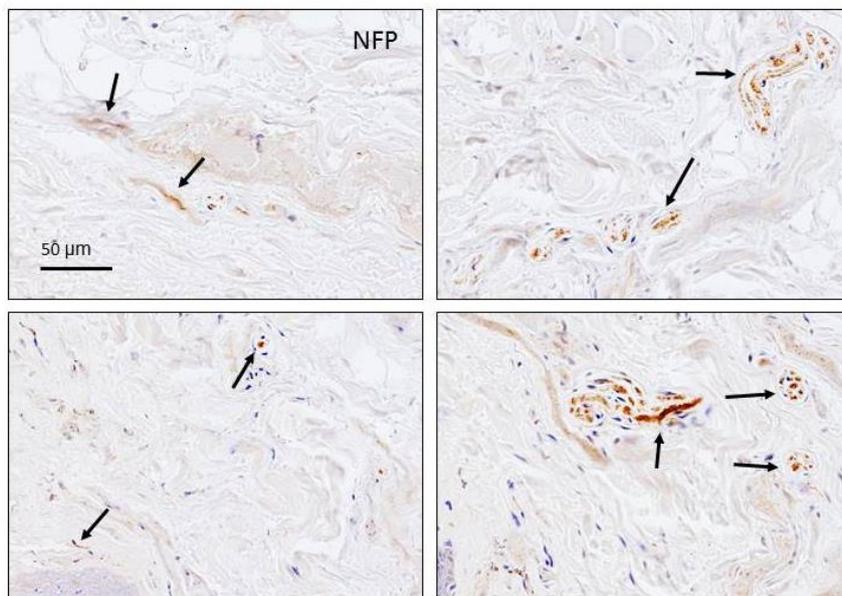


Figura 5.64.- Perfiles nerviosos (flechas) Perfiles nerviosos (flechas) en la dermis del labio superior. Ocasionalmente se han observado en esta localización estructuras semejantes a corpúsculos sensitivos de tipo Ruffini.

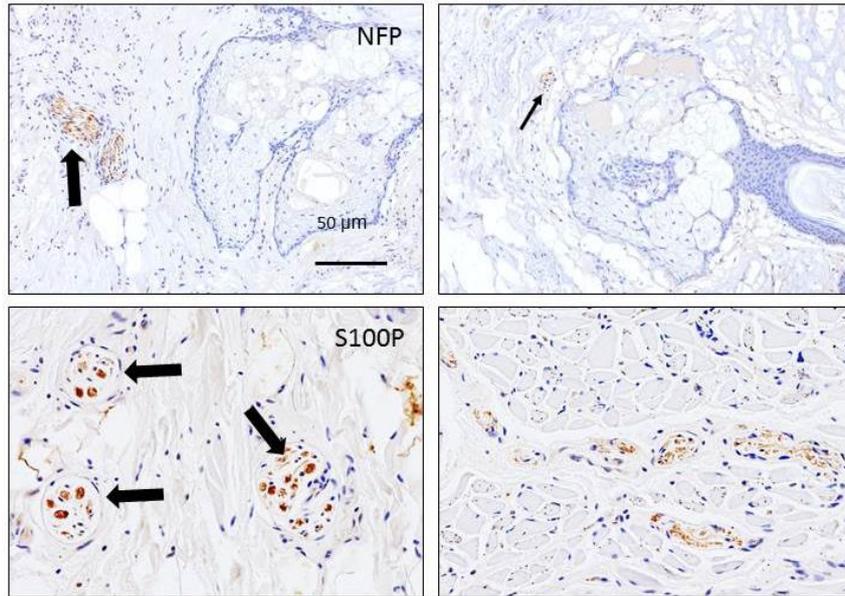


Figura 5.65.- Perfiles nerviosos (flechas) Perfiles nerviosos (flechas) en la dermis del labio superior en relación con las glándulas. Ocasionalmente se han observado en esta localización estructuras semejantes a corpúsculos sensitivos de tipo Ruffini y en relación con las fibras musculares.

5.2.3.6.- **Ceja.-** En la ceja, en sus segmentos interno y externo, pero más claramente en el primero, puede diferenciarse un SMAS y por debajo de él perfiles nerviosos de distintos calibres (**Figuras 5.66 y 5.67**). Son nervios de diámetros pequeño e intermedio.

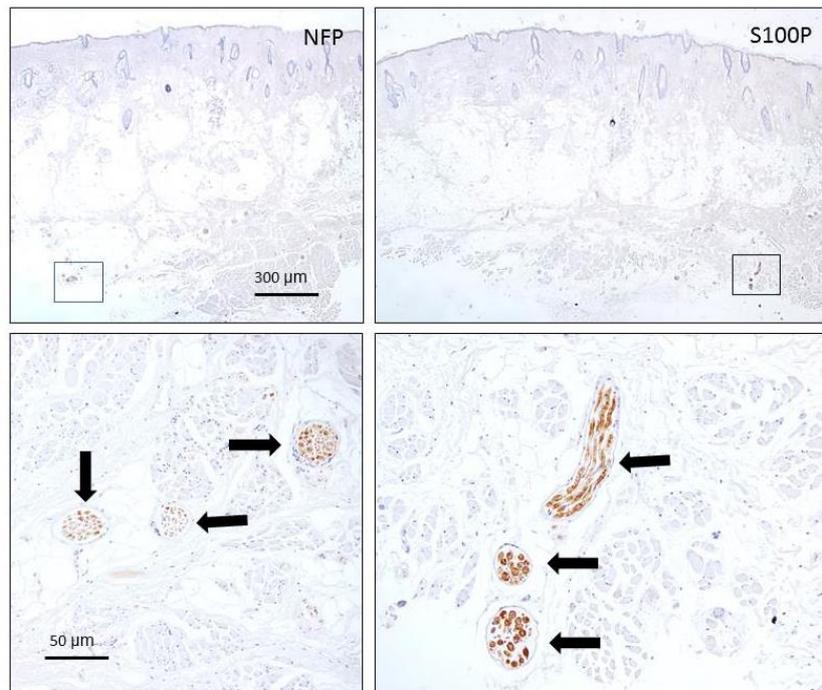


Figura 5.66.- Perfiles nerviosos (flechas) en los diferentes planos histológicos de la región de las cejas (tercio interno).

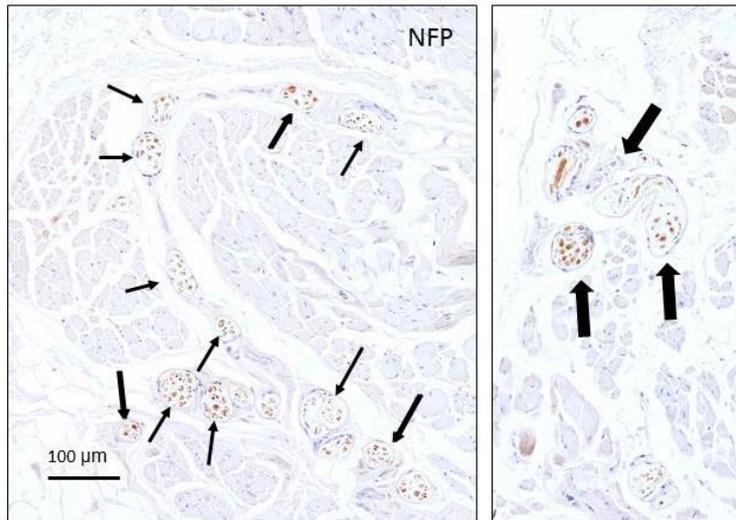


Figura 5.67.- Perfiles nerviosos (flechas) en los diferentes planos histológicos de la región de las cejas (tercio interno) en relación con las fibras musculares del músculo corrugator supercilii.

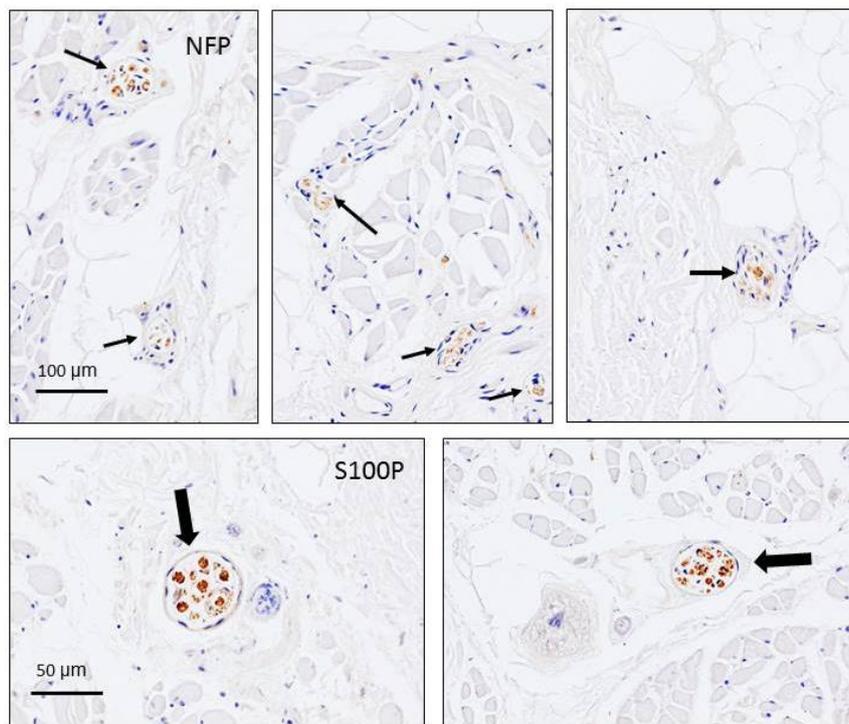


Figura 5.68.- Perfiles nerviosos (flechas) en los diferentes planos histológicos de la región de las cejas (tercio externo) en relación con las fibras musculares del músculo corrugator supercilii.

No se han encontrado perfiles nerviosos en la dermis o tejidos fibroadiposos subyacentes, ni tampoco en relación con los folículos pilosos. Por el contrario los nervios fueron abundantes entre las fibras musculares del músculo corrugator y en el tejido conectivo laxo que lo rodea (**Figuras 5.67 y 5.68**). La

organización de algunos perfiles nerviosos recuerda a la de corpúsculos sensitivos paciniformes (**Figura 5.68**).

5.2.3.7.- *Párpado superior*.- Los nervios del párpado superior se detectan en todos los estratos histológicos del mismo, salvo en el tarso (ver **figura 5.42**). En todas las muestras estudiadas en la zona ventral del párpado se encuentra un gran tronco nervioso y gran cantidad de nervios también catalogados como de gran diámetro en la zona ventral de las fibras musculares del orbicular de los párpados (**Figuras 5.69 y 5.70**).

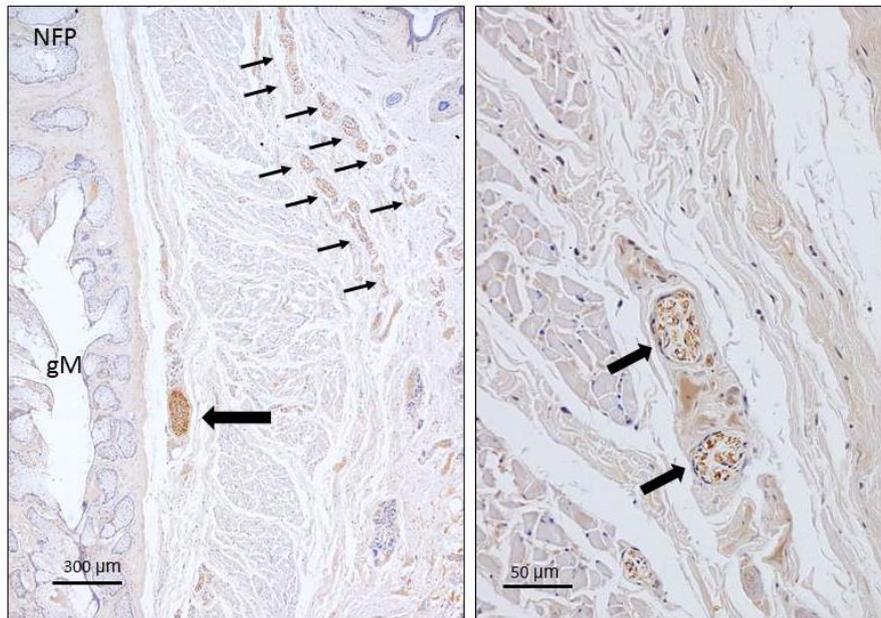


Figura 5.69.- Perfiles nerviosos (flechas) en el párpado superior.

Igualmente se han encontrado abundantes perfiles nerviosos en la dermis y en la capa subconjuntival. Se trata de nervios de pequeño diámetro inmersos en el tejido conectivo, que nunca llegan a penetrar en espesor del epitelio, no forman estructuras nerviosas sensitivas diferenciadas y que tampoco se encuentran en relación con los bulbos de las pestañas (**Figura 5.71**).

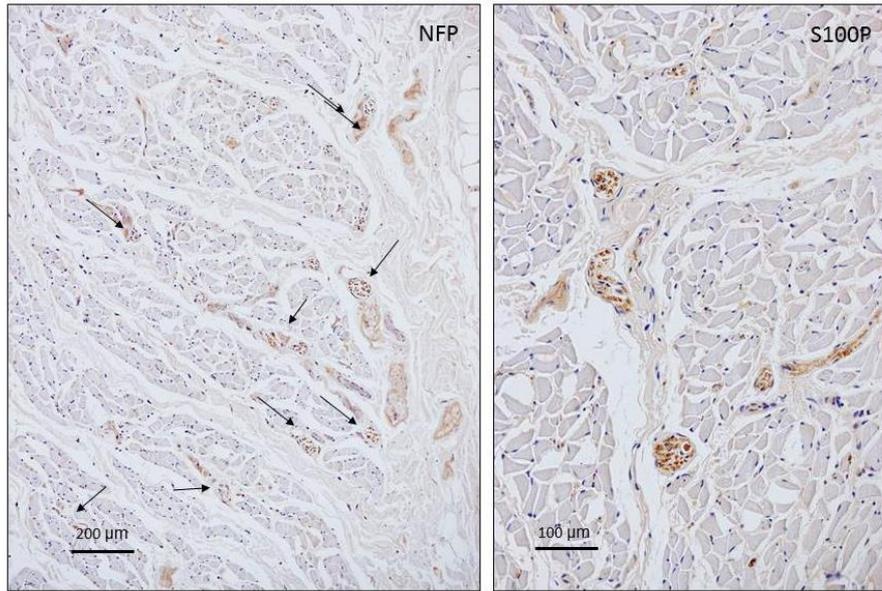


Figura 5.70.- Perfiles nerviosos (flechas) en el párpado superior.

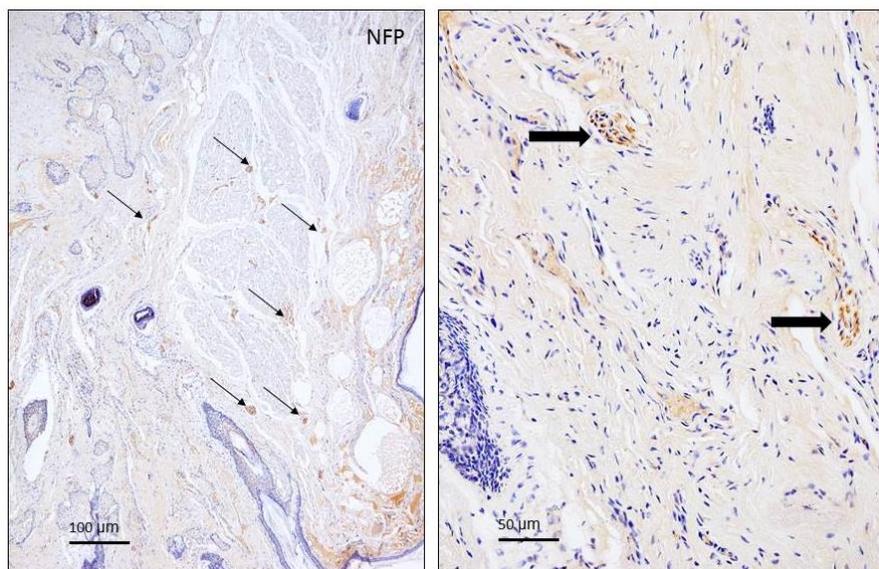


Figura 5.71.- Perfiles nerviosos (flechas) en el párpado superior.

5.3. Inervación propioceptiva de los músculos faciales

5.3.1. Presencia de husos neuromusculares en los músculos inervados por el nervio trigémino

El primer paso en el estudio de la propiocepción de los músculos faciales fue confirmar si, como dicen la mayoría de los autores, los músculos inervados por la rama mandibular del nervio trigémino poseen husos neuromusculares típicos,

y alguna otra estructura nerviosa cuya morfología y perfil inmunohistoquímico consienta identificarlos como propioceptores. Se estudiaron muestras de los músculos masetero, temporal, pterigoideo interno y vientre anterior del digástrico.

En todos estos músculos y en todos los especímenes estudiados se encontraron husos neuromusculares formados por un número variable de fibras intrafusaes (entre 4 y 12). La morfología de estas formaciones sensitivas varía de acuerdo con la sección pero siempre se trata de estructuras perfectamente capsuladas y, en muchos casos, dentro de la cápsula se encuentran los nervios que los suplen (Figuras 7.72 y 5.73).

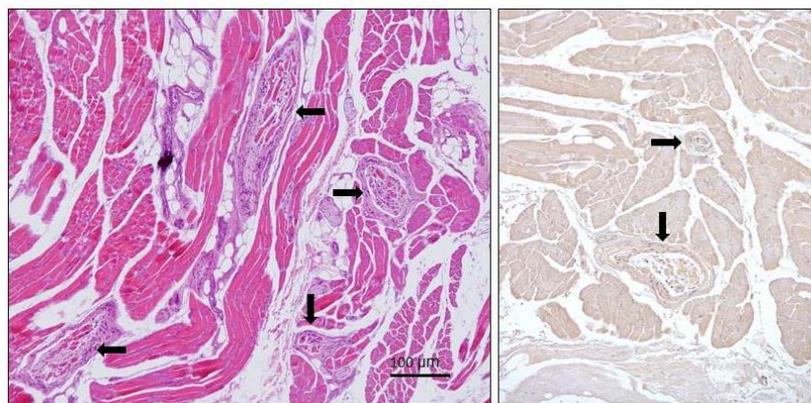


Figura 5.72.- Husos neuromusculares (flechas) en el músculo masetero.

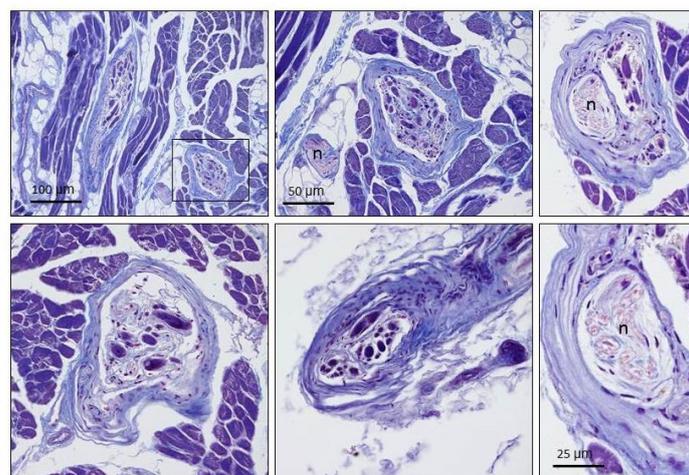


Figura 5.73.- Husos neuromusculares (flechas) en el músculo masetero. n: nervio.

Los nervios que suplen a estas formaciones están formados por un número variable de fibras nerviosas mielínicas, que pierden la cubierta de células de Schwann al penetrar dentro de las mismas (**Figura 5.74**).

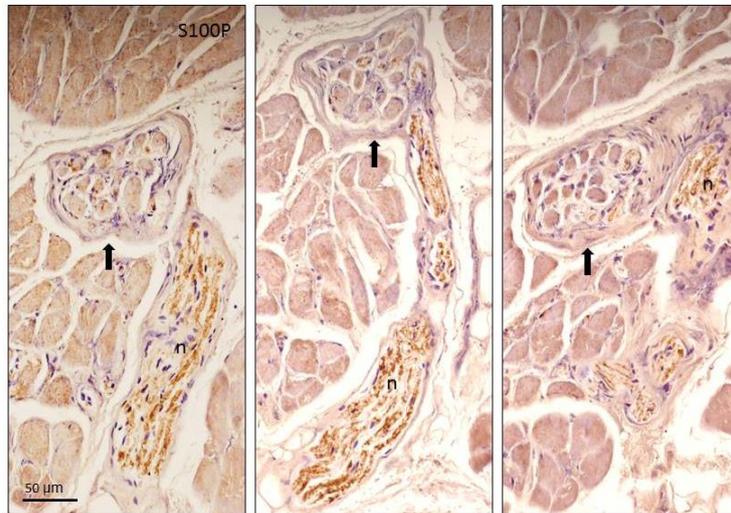


Figura 5.74.- Husos neuromusculares en el músculo pterigoideo interno (flechas) mostrando el perfil inmunohistoquímico para la proteína S100 de las fibras nerviosas que los suplen.

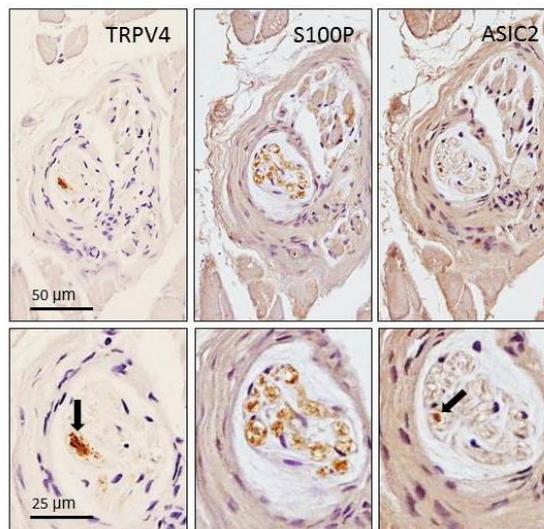


Figura 5.75.- Secciones seriadas de un huso neuromuscular del músculo masetero mostrando inmunorreacción en el nervio que lo suple para la proteína S100 y las mecanoproteínas TRPV4 y ASIC2.

Los husos neuromusculares de los vertebrados poseen doble inervación sensitiva y motriz por las motoneuronas γ . Con el fin de conocer si alguna de las fibras que llegan a ellos es de naturaleza mecanoceptora, se han realizado experimentos para detectar fibras que expresan mecanoproteínas. En nuestros

experimentos una pequeña población de fibras nerviosas expresan inmunorreacción para las mecanoproteínas ASIC2, TRPV4 y Piezo2 (**Figuras 5.75 y 5.76**).

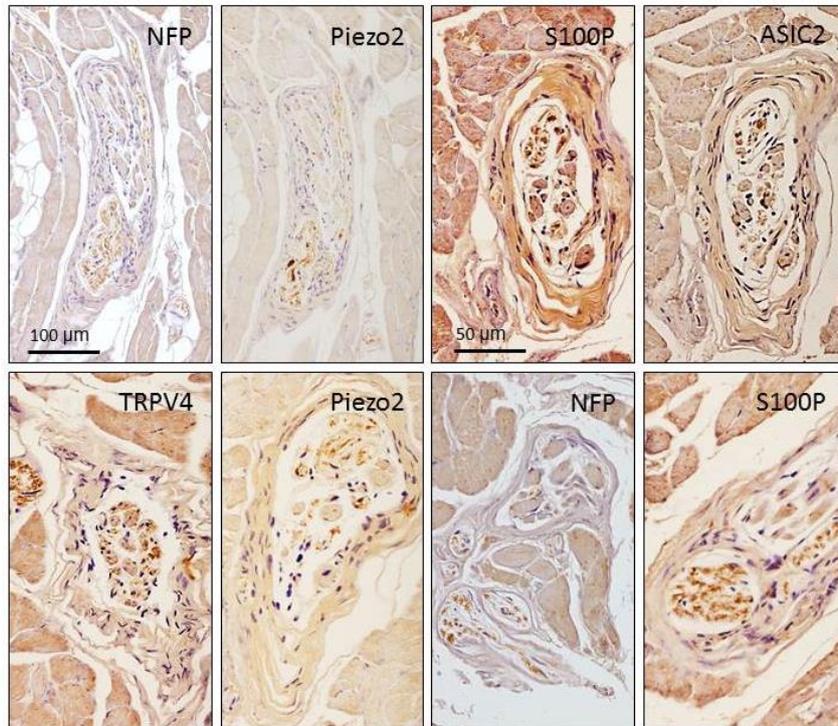


Figura 5.76.- Secciones husos neuromusculares del músculo masetero mostrando inmunorreacción en el nervio que lo suple para la proteína S100, el NFP y las mecanoproteínas Piezo, TRPV4 y ASIC2

5.3.2. Clasificación de las formaciones sensitivas de los músculos faciales

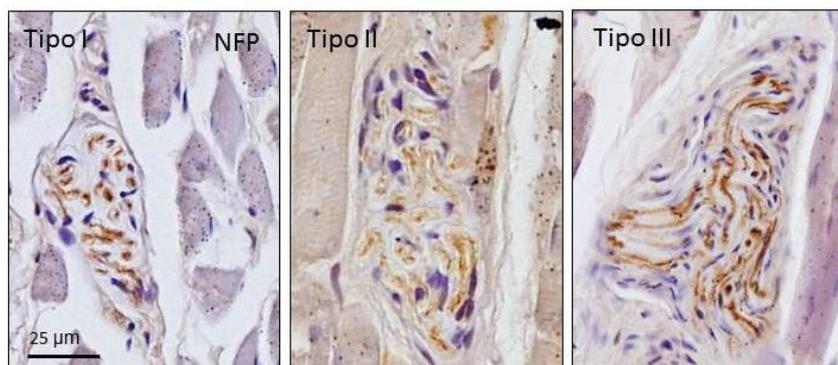


Figura 5.77.- Tipos morfológicos de propioceptores en los músculos faciales humanos.

Dada la heterogenicidad morfológica de las estructuras nerviosas que cumplen los criterios para ser clasificadas como propioceptores, a efectos de este

estudio, se las ha clasificado en tres grandes tipos: tipo I: formaciones completamente capsuladas, tipo II: formaciones con una cápsula parcialmente diferenciada; tipo III: sin cápsula aparente.

5.3.3. Descripción de las formaciones sensitivas de los músculos faciales

La identificación de los receptores sensitivos en los músculos faciales se basó en los siguientes criterios: estar fuera del trayecto de nervios, estar relacionados íntimamente con las fibras musculares, y presentar un aspecto morfológicamente diferenciado. Además se ha considerado como hecho discriminatorio definitivo la expresión de alguna mecanoproteína dentro de ellos (tanto en el axón como en las células gliales periaxónicas).

La variabilidad de la morfología de las formaciones nerviosas sensitivas consideradas como propioceptoras fue muy grande, así como la densidad de las mismas en las secciones musculares en las diferentes zonas de la cara. En las formaciones de tipo I, la disposición de los elementos gliales (inmunorreactivos para la proteína S100) fue muy variable y las células de diferentes tamaños y formas (**Figuras 5.78, 5.84 y 5.85**).

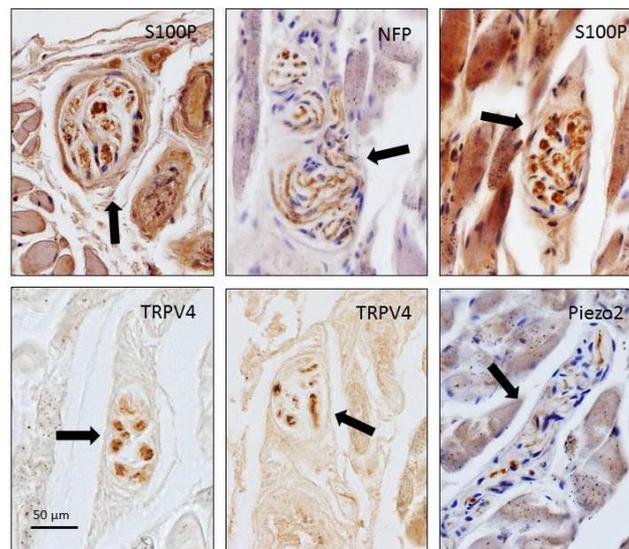


Figura 5.78.- Detección inmunohistoquímica de la proteína S100, neurofilamentos y mecanoproteínas en diferentes morfotipos de mecanorreceptores musculares (flechas).

Otro tanto puede afirmarse de la disposición de los axones dentro de las formaciones de tipo I. En algunos casos los axones neurofilamento positivos se disponen formando ovillos (**Figura 5.80**); en otros se trata de perfiles axónicos de distintos calibres localizados dentro de una cápsula más o menos organizada (**Figuras 5.82, 5.83 y 5.85**); en otros son perfiles axónicos de un calibre regular que termina en pequeñas dilataciones (**Figura 5.84**).

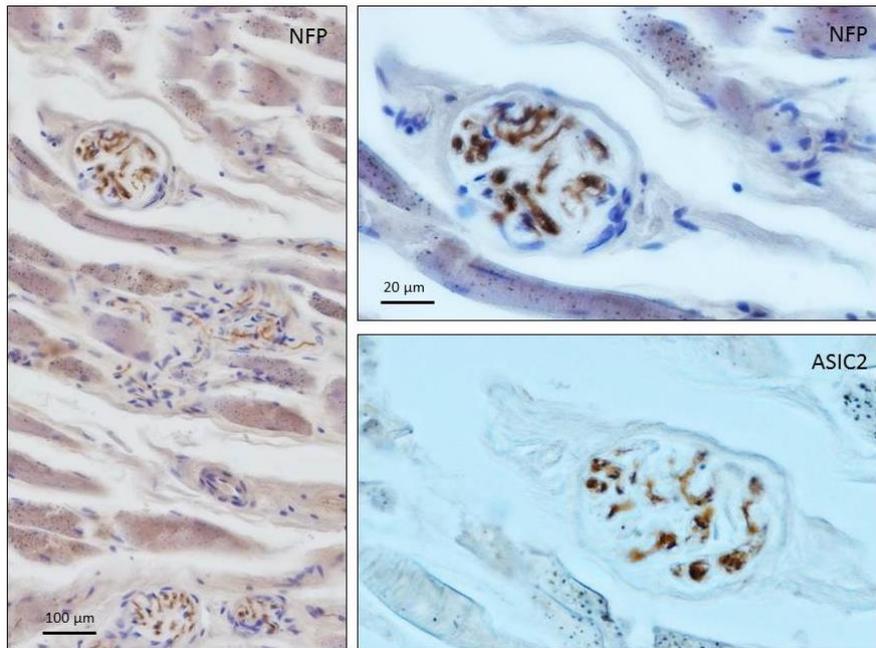


Figura 5.79.- Detección inmunohistoquímica de los neurofilamentos en una formación sensitiva de tipo I presente en el músculo bucal. La comparación de secciones seriadas permite observar que la mecanoproteína ASIC2 se encuentra en estas formaciones aparentemente restringida al axón.

Las terminaciones nerviosas más abundantes correspondieron a las clasificadas dentro del grupo II. Son estructuras parcialmente capsuladas, de morfologías muy variables en las que predomina el componente axónico (**Figuras 5.82 a 5.84**) sobre el glial, aunque también las células de Schwann corpusculares pueden localizarse claramente en ellas (**Figura 5.81**). En la mayoría de los casos la orientación del eje mayor de estas formaciones era paralela al de las fibras musculares y la “cápsula” que rodean a las fibras nerviosas se confunde con el perimio.

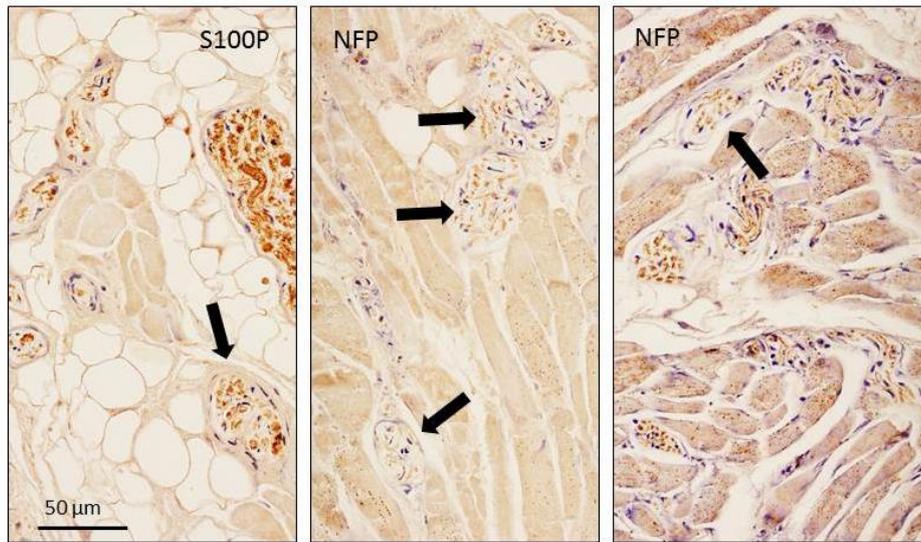


Figura 5.80.- Detección inmunohistoquímica de la proteína S100 y los neurofilamentos en diferentes formaciones sensitivas de tipo II (flechas).

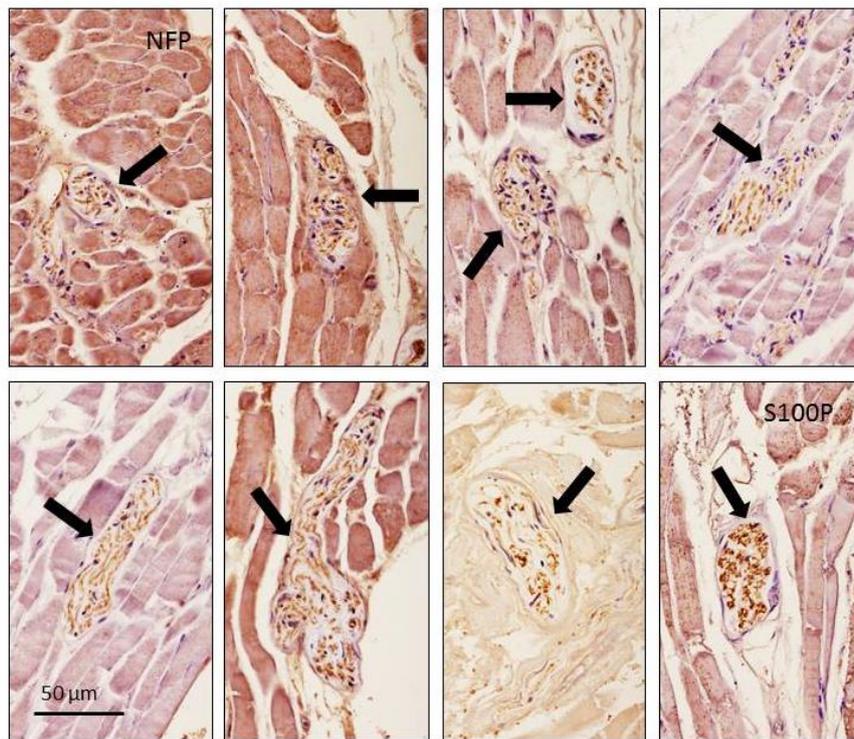


Figura 5.81.- Detección inmunohistoquímica de la proteína S100 y los neurofilamentos en diferentes formaciones sensitivas de tipo I y de tipo II (flechas).

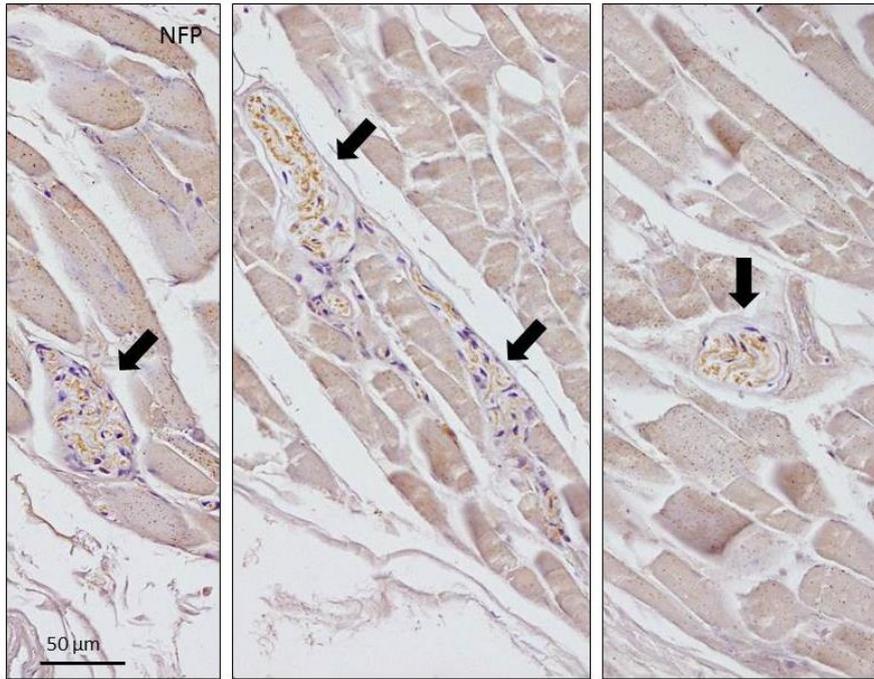


Figura 5.82.- Detección inmunohistoquímica de los neurofilamentos en diferentes formaciones sensitivas de tipo II (flechas).

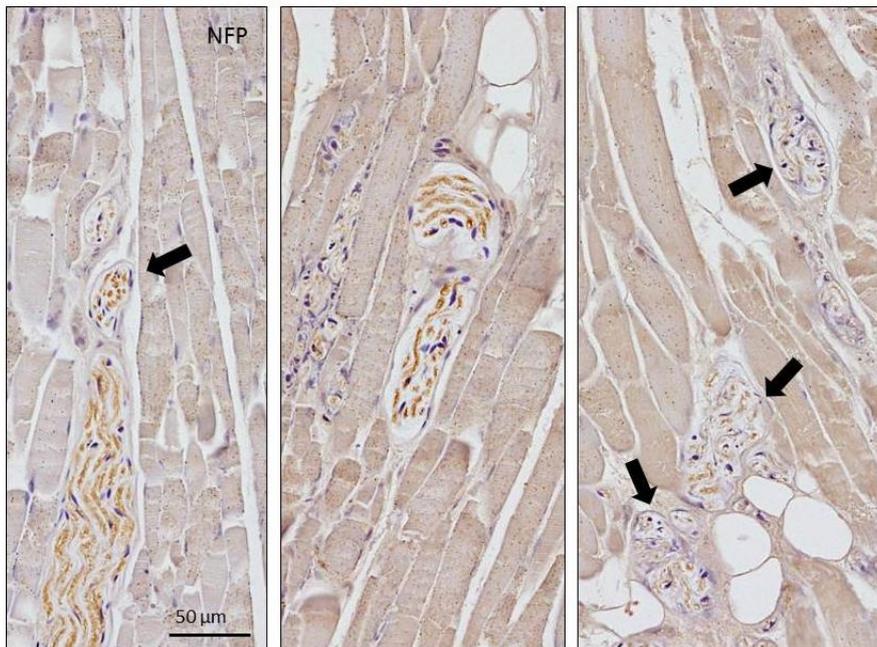


Figura 5.83.- Detección inmunohistoquímica de los neurofilamentos en diferentes formaciones sensitivas de tipo I y de tipo II (flechas).

Y por lo que respecta a las formaciones de tipo III, su identificación es la más compleja ya que en ocasiones pueden ser confundidas con fibras nerviosas aisladas; pero a diferencia de lo indicado para las formaciones de tipo II, la organización de las fibras nerviosas es muy irregular (**Figuras 5.85 a 5.90**).

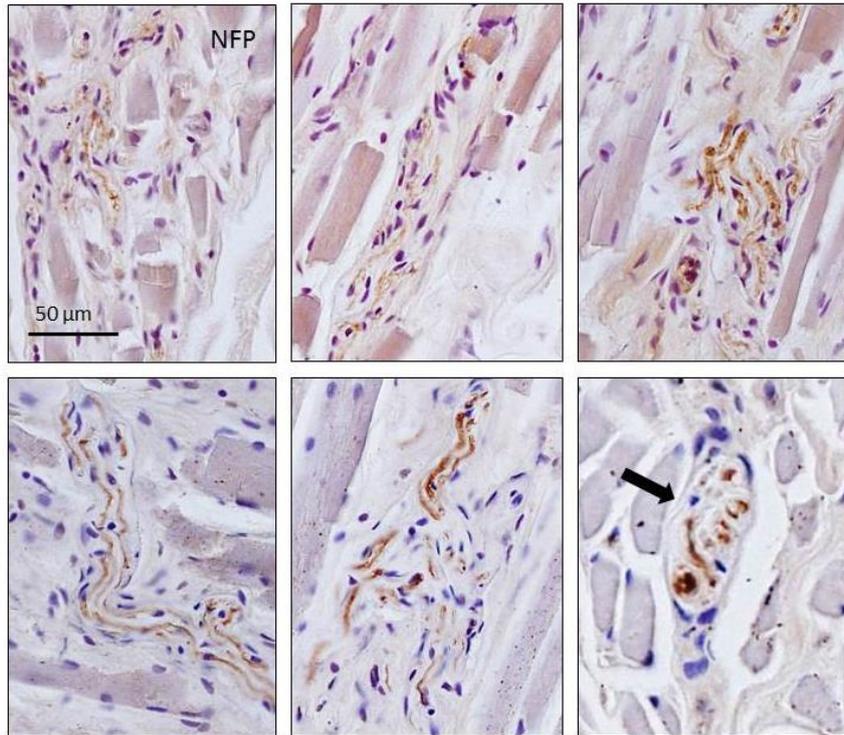


Figura 5.84.- Detección inmunohistoquímica de los neurofilamentos en diferentes formaciones sensitivas de tipo I (flecha) II y III.

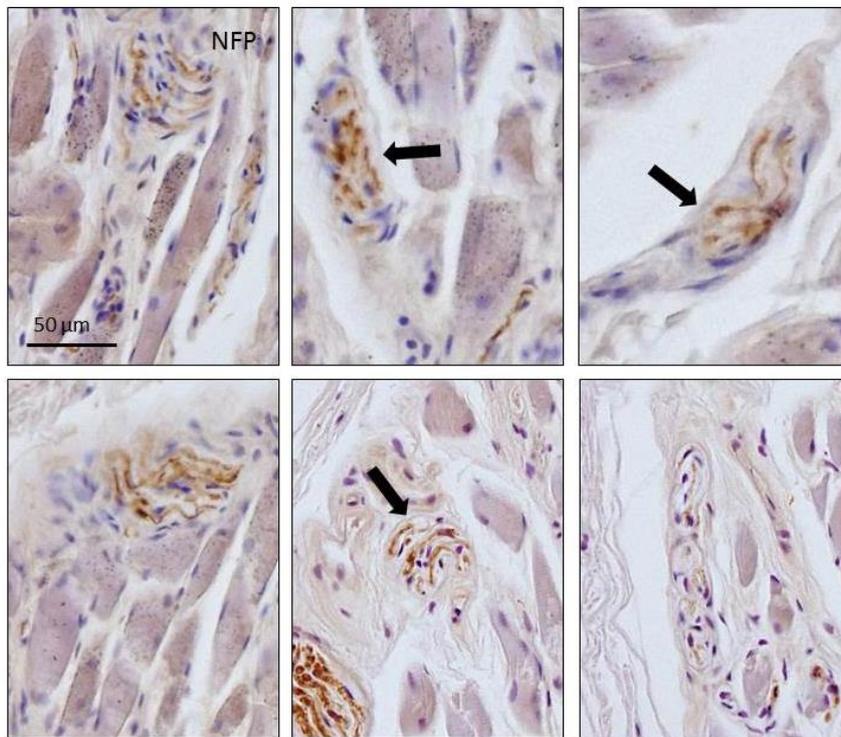


Figura 5.85.- Detección inmunohistoquímica de los neurofilamentos en diferentes formaciones sensitivas de tipos II y III, y una formación de tipo I (flechas en la figuras central y derecha de la fila superior).

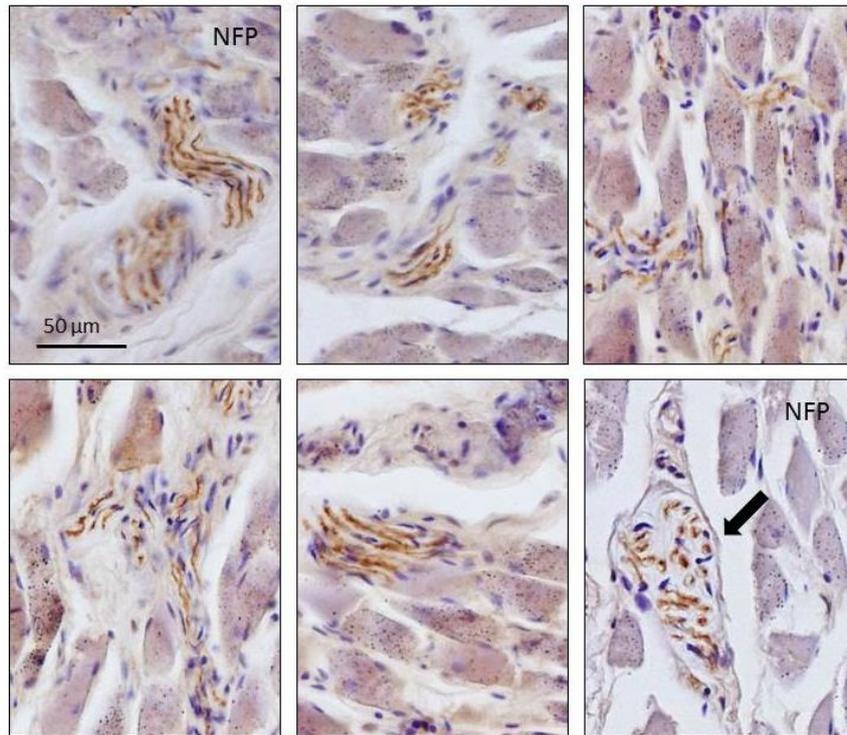


Figura 5.86.- Detección inmunohistoquímica de los neurofilamentos en diferentes formaciones sensitivas de tipo III y en una formación de tipo I (flecha).

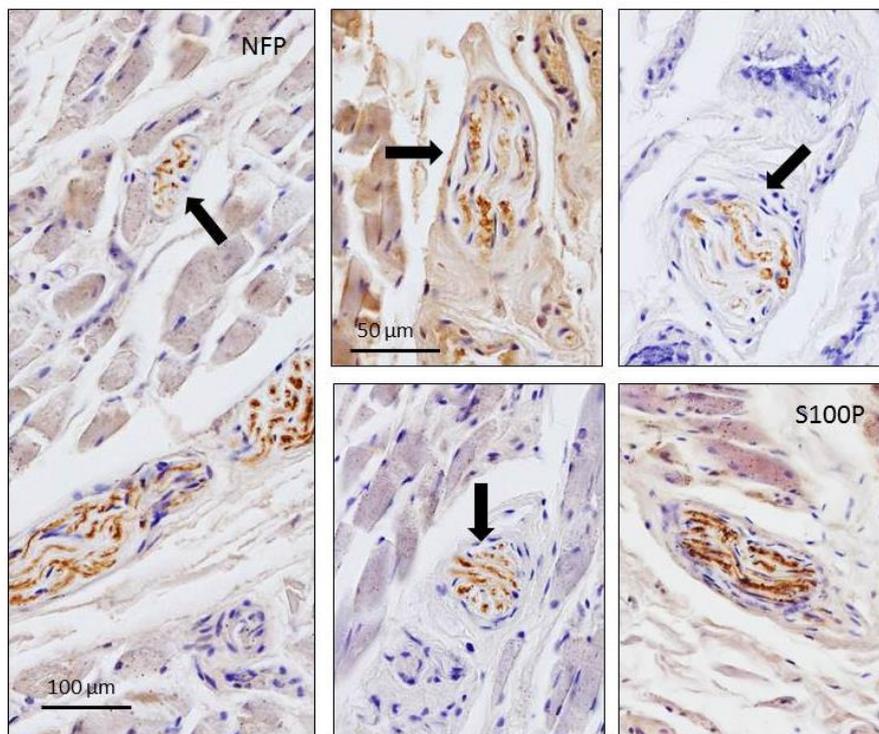


Figura 5.87.- Detección inmunohistoquímica de los neurofilamentos en diferentes formaciones sensitivas de tipo III y en una formación de tipo I (flecha).

5.3.4. Densidad de formaciones sensitivas en los músculos faciales

En las secciones de las diferentes zonas de la cara procesadas para la detección de los neurofilamentos se ha realizado una cuantificación de las formaciones nerviosas sensitivas de los diferentes tipos, en músculos correctamente identificados.

Tabla 5.3.- Densidad de formaciones nerviosas presentes en los músculos faciales. Los contajes se realizaron en 5 secciones por cada una de las regiones preestablecidas con una separación entre los cortes de 200 µm.

Músculo	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Fibras
M. corrugator supercilii + M. depressor supercilii	1	3	7	Si
M. orbicularis oculii pars palpebralis pars orbitalis	3	11	9	Si
M. orbicularis oris pars marginalis pars labialis	5	19	12	Si
M. zygomaticus maior	1	4	4	Si
M. zygomaticus minor	1	2	0	Si
M. buccinator	19	28	10	Si
M. depressor labii inferioris + mentalis	0	8	2	

5.3.5. Presencia de mecanoproteínas en las formaciones sensitivas de los músculos faciales

En la actualidad se considera que el proceso de mecanosensación, y la propiocepción es una de sus variantes, depende de la expresión por las fibras nerviosas de determinados tipos de canales iónicos. Entre ellos se encuentran el ASIC2, el TRPV4 y el Piezo2. En este trabajo, mediante cortes seriados o doble inmunomarcaje, se ha podido demostrar la existencia de alguna de estos canales iónicos en los axones y/o células gliales de las estructuras identificadas como posibles propioceptores de los músculos faciales.

Como se aprecia en las **figuras 5.79 a 5.81** y **Figura 5.90** dentro de los propioceptores de tipo I se han inmunorreacción para ASIC2, TRPV4 y Piezo2, y en cortes seriados la inmunorreacción es evidente que se localiza en los axones.

Otro tanto puede firmarse respecto a las formaciones sensitivas de tipo II (**Figura 5.89**) y de tipo III (**Figura 5.81**). En todos los músculos faciales identificados se han encontrado fibras nerviosas que expresan inmunorreacción para alguna de las mecanoproteínas investigadas, y en algunos casos dispuestas como formaciones nerviosas sensitivas (**Figura 5.91**).

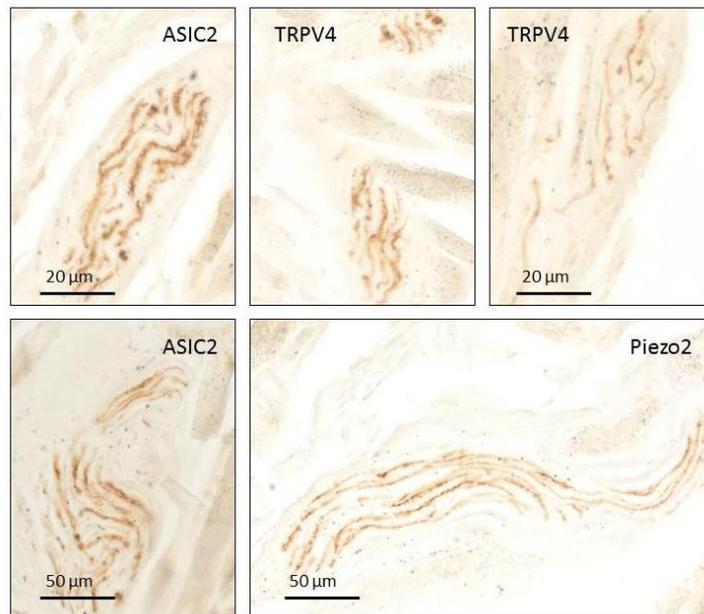


Figura 5.88.- Perfiles nerviosos y estructura sensitivas de tipo I (imagen superior derecha) en los músculos faciales que expresan inmunorreacción para diferentes mecanoproteínas.

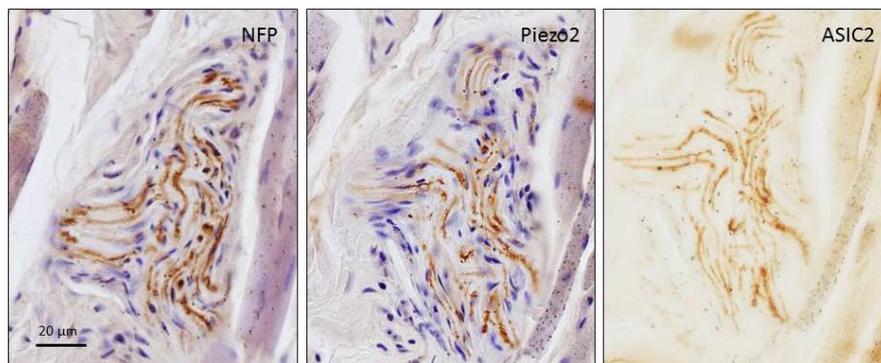


Figura 5.89.- Cortes seriados de una formación sensitiva de tipo III mostrando la localización axónica de las mecanoproteínas investigadas y la aparente co-localización de algunas de ellas.

De acuerdo con las premisas previamente comentadas, se han encontrado estructuras nerviosas sensitivas, de tamaños y morfologías variables, con varios perfiles axónicos dispuestos de numerosas maneras. En ocasiones asemejan corpúsculos de Ruffini-like

redondeados o alargados y en ellos se ha detectado inmunorreacción para ASIC 2 (Figuras 5.92 y 5.93), TRPV4 (Figuras 5.94 y 5.95) y Piezo2 (Figuras 5.96 y 5.97).

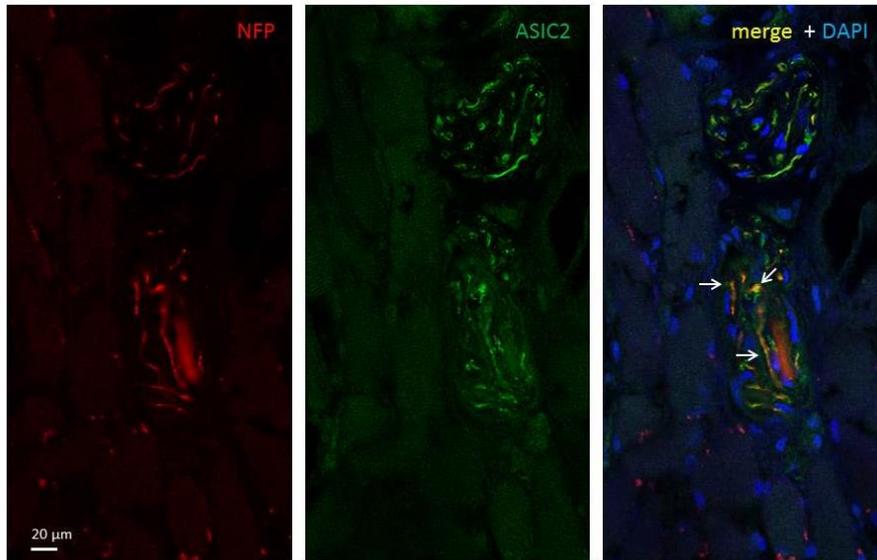


Figura 5.90.- Corpúsculos capsulados (tipo I) en el músculo bucal procesados para la inmunodetección de los neurofilamentos y ASIC2. En algunas fibras intracorpúsculares ambas proteínas se encuentran co-localizadas.

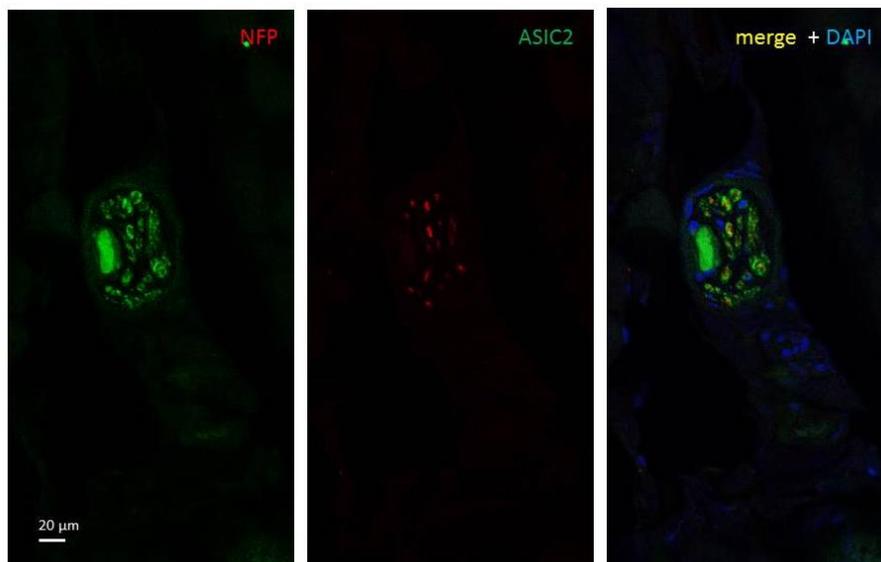


Figura 5.91.- Figura 5.92.- Corpúsculo capsulado (tipo I) en el músculo zigomático mayor procesados para la inmunodetección de los neurofilamentos y ASIC2. En algunas fibras intracorpúsculares ambas proteínas se encuentran co-localizadas.

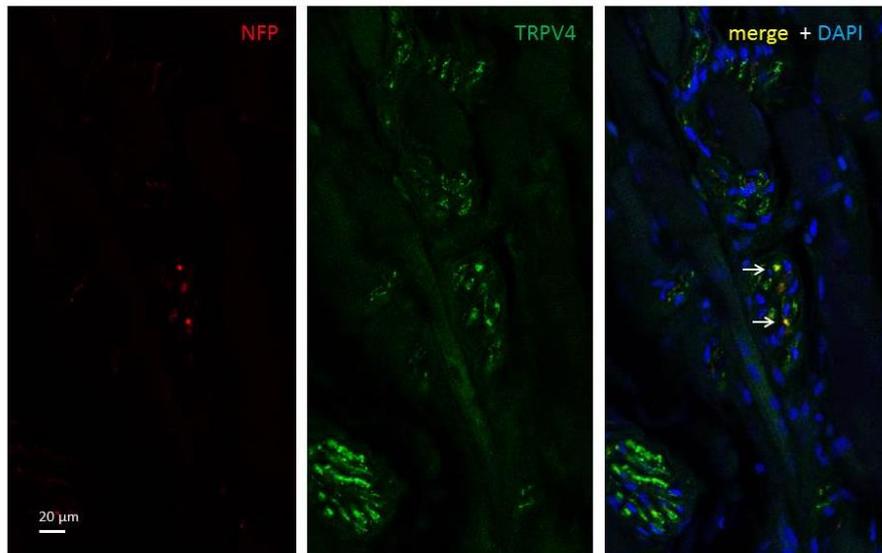


Figura 5.92.- Corpúsculos no capsulados (tipo II) en el músculo bucal procesados para la inmunodetección de los neurofilamentos y TRPV4. En algunas fibras intracorporculares ambas proteínas se encuentran co-localizadas.

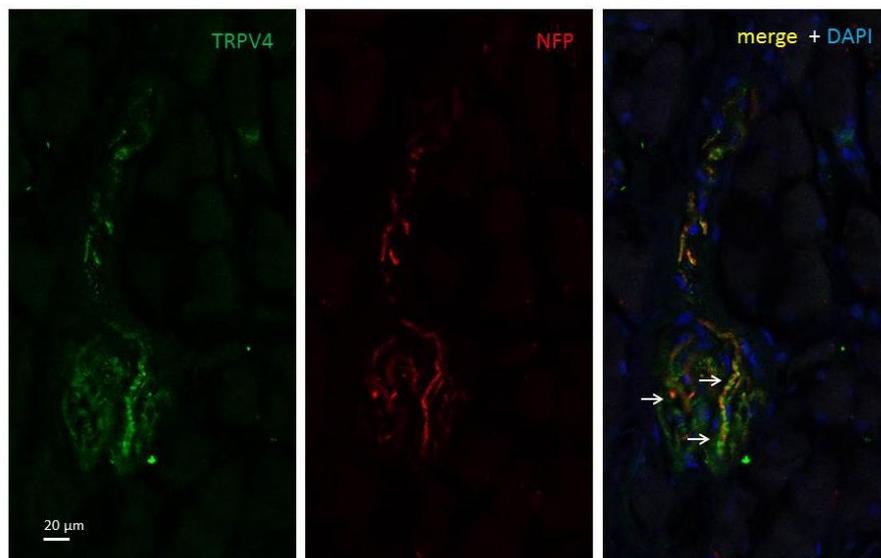


Figura 5.93.- Corpúsculos no capsulados (tipo II) en el músculo bucal procesados para la inmunodetección de los neurofilamentos y TRPV4. En algunas fibras intracorporculares ambas proteínas se encuentran co-localizadas.

Aunque no se ha realizado un estudio cuantitativo de la presencia de estas estructuras, se han detectado en todos los músculos faciales analizados, encontrándose entre 1 y 4 por sección. Pero en ningún caso se han observado husos neuromusculares típicos, fuera del territorio de los músculos del trigémino, ni se ha explorado la posible co-localización de estas proteínas en la misma estructura nerviosa.

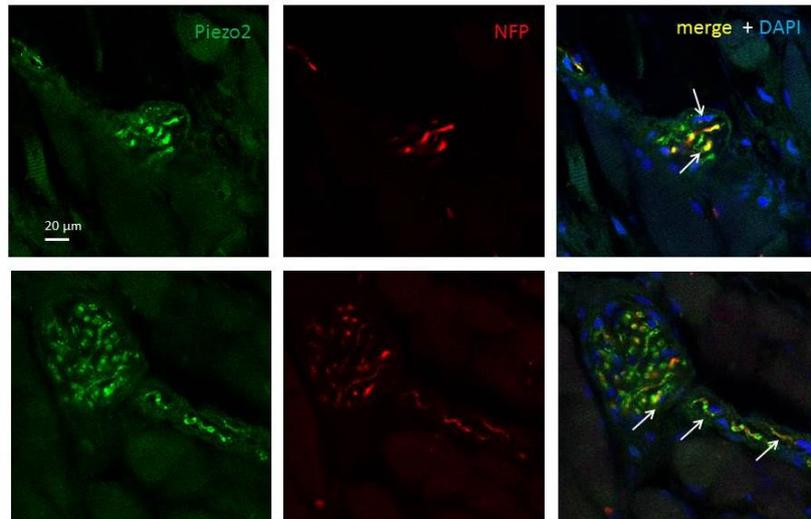


Figura 5.94.- Corpúsculos capsulados (tipo I), tipo Ruffini-like en el músculo masetero procesados para la inmunodetección de los neurofilamentos y Piezo2. En algunas fibras intracorpúsculares ambas proteínas se encuentran co-localizadas.

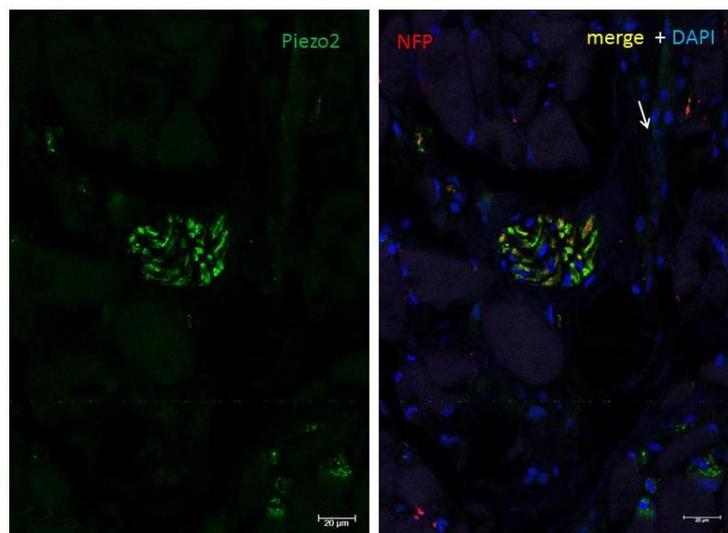


Figura 5.95.- Corpúsculos no capsulados (tipo III), en el músculo masetero procesados para la inmunodetección de los neurofilamentos y Piezo2. En algunas fibras intracorpúsculares ambas proteínas se encuentran co-localizadas.

5.4. El sistema NT-3/TrkC determina la presencia de husos neuromusculares inervados por el trigémino, pero no el facial

El desarrollo de los husos neuromusculares de los mamíferos está regulado por diferentes factores de crecimiento y de transcripción entre los que destacan la neurotrofina-3 (NT-3) y su receptor de alta afinidad TrkC. La acción se ejerce

controlado la formación de las neuronas propioceptivas de los ganglios raquídeo que influyen los mioblastos para determinar su fenotipo como células musculares intrafusales en lugar de rbdomiocitos. Sin embargo, como ya se expuso en el apartado correspondiente, existen dudas sobre si las neuronas del núcleo mesencefálico del trigémino es capaz de regular el desarrollo de los husos neuromusculares de los músculos de la cabeza, especialmente de los músculos masticadores.

Como punto de partida se analizaron los husos neuromusculares del músculo gastroemio de ratones de 15 días y genotipo salvaje, con el fin de establecer las características de los mismos. Están formados por cuatro fibras intrafusales de las que dos son del tipo de “cadena nuclear” y otras dos de tipo “saco nuclear” (**Figura 5.98**). 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.

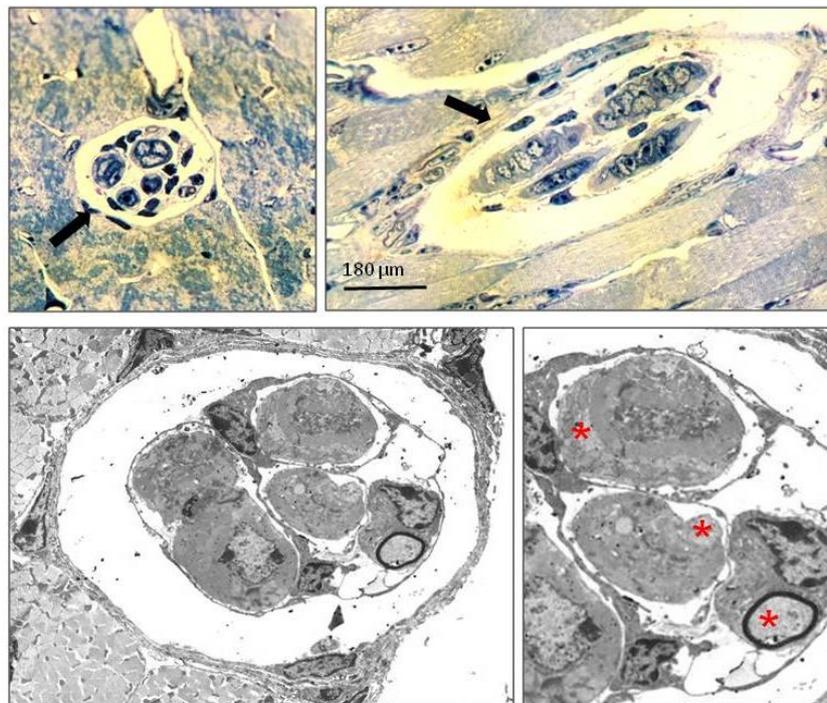


Figura 5.96.- Cortes semifinos transversal y longitudinal de husos neuromusculares del músculo gastroemio de ratón de 15 días de genotipo salvaje. En la parte inferior se observa un huso neuromuscular en sección transversal mostrando los diferentes componentes del mismo (magnificación original x5000) y un detalle de los nervios en la zona ecuatorial del huso (asteriscos).

Al microscopio electrónico, alrededor de las fibras intrafusales puede apreciarse la presencia de fibroblatos que rodean las fibras intrafusales y diferentes tipos de terminaciones nerviosas. Los husos neuromusculares poseen doble inervación. Por un lado tienen placas motrices en sus extremos formadas por los axones de las motoneuronas γ ; por otro, poseen inervación sensitiva proporcionada por las prolongaciones periféricas de las neuronas propiocepticas (subtipos $A\alpha$ y $A\beta$) de los ganglios raquídeos que forman las denominadas terminaciones anulo-espinales y “en pétalos de flor”. Desde el punto de vista morfológico las fibras sensitivas se caracterizan por poseer numerosas mitocondrias y poco citoesqueleto (**Figura 5.96**).

En estos mismos animales se observan fibras nerviosas en las proximidades de los husos neuromusculares aunque no se han detectado en relación directa con las fibras musculares intrafusales (**Figura 5.97**). Posiblemente ello sea debido a que el marcador utilizado para detectar las fibras nerviosas fue la proteína S100, que marca las células de Schwann, y en la mayoría de los casos los axones entran desnudos en el interior de los husos.

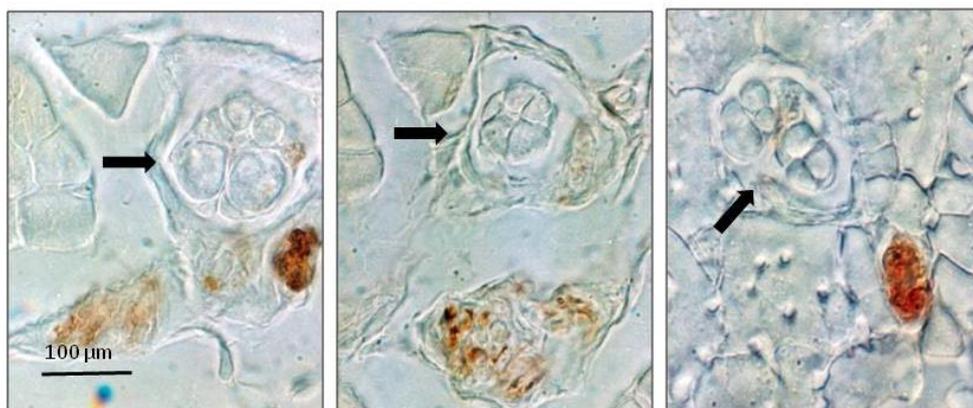


Figura 5.97.- Detección inmunohistoquímica de la proteína S100 en secciones del músculo gastronemio de un ratón de 15 días de genotipo salvaje. Los husos están perfectamente desarrollados pero no se detecta inmunorreacción positiva en contacto directo con las fibras intrafusales.

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 encontrado husos neuromusculares en los músculos inervados por el trigémino (masetero, perigoideos y milohioideo) de animales de genotipo +/+ y +/-, nunca en los animales -/-, tanto de NT-3 como de TrkC. En ambos casos, las fibras intrafusales tienen una ultraestructura compatible con la normalidad y los de inervación motriz y sensitiva son normales.

Los animales deficientes de NT-3 se estudiaron el día del nacimiento ya que la mutación es letal y más del 80% de los animales mueren dentro de las primeras 24 horas de vida. En los animales de genotipo salvaje observaron perfiles morfológicos de husos neuromusculares en todos los músculos estudiados (**Figura 5.198**), si bien en algunos casos no estaban completamente diferenciados debido a la corta edad de los animales.

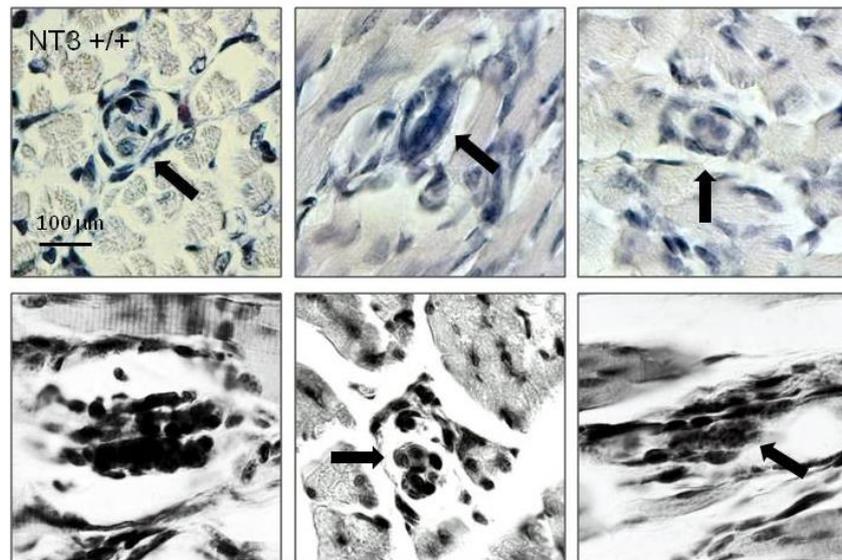


Figura 5.98.- Perfiles de husos neuromusculares en secciones de músculos perigoideo (superior) y milohioideo (inferior) de un ratón NT-3 +/- de 0 días. Tinción de H&E

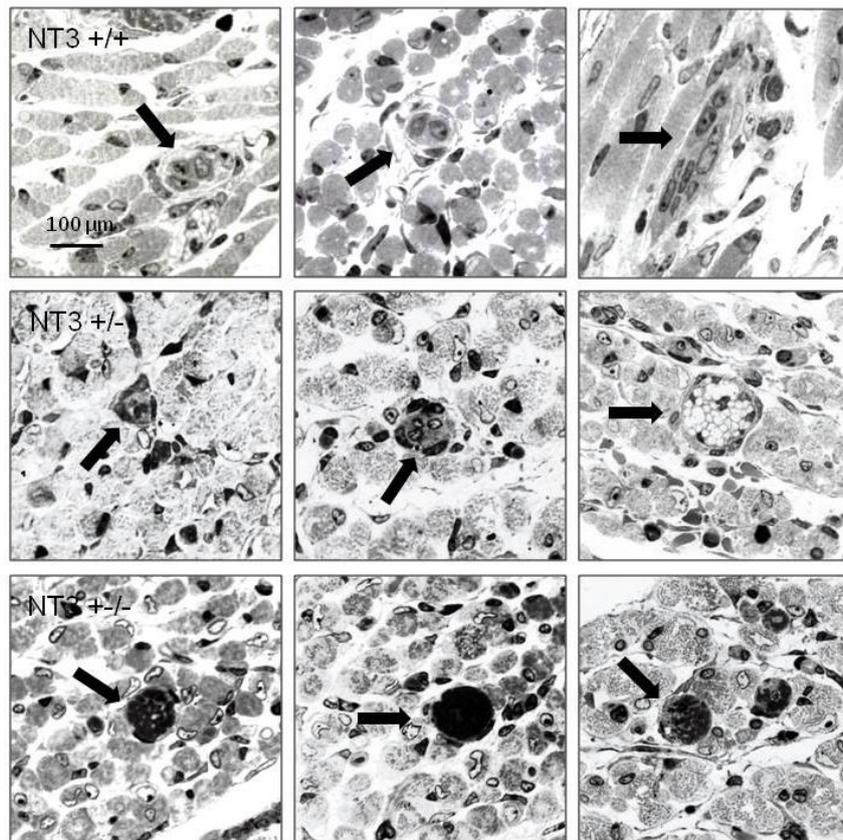


Figura 5.99.- Cortes semifinos del músculo masetero correspondientes animales de genotipo salvaje (fila superior), heterocigotos para la mutación (fila central) y homocigotos para la mutación (fila inferior). Tinción de azul de toluidina.

En los animales de heterocigotos para la mutación en NT-3 junto con husos neuromusculares e morfología normal se han encontrado otros de aspecto aberrante en las que no son diferenciables las fibras intrafusales porque ofrecen un aspecto vacuolado (**Figura 5.99**). En los animales deficientes en NT-3 no se han detectado en ningún caso husos neuromusculares mientras que se han encontrado de forma constante estructuras muy densas, así como algunas vacuoladas, que seguramente se corresponden con husos neuromusculares degenerados. Es decir, los husos en estos animales se formarían pero degeneran una vez formados.

Al analizar la inervación de los husos neuromusculares en estos dos últimos grupos de animales, en los de genotipo +/+ y +/- se observaron perfiles de

nervios en las proximidades de los husos y dentro de ellos, en algunos casos formando terminaciones anulo espirales típicas (**Figura 5.100**).

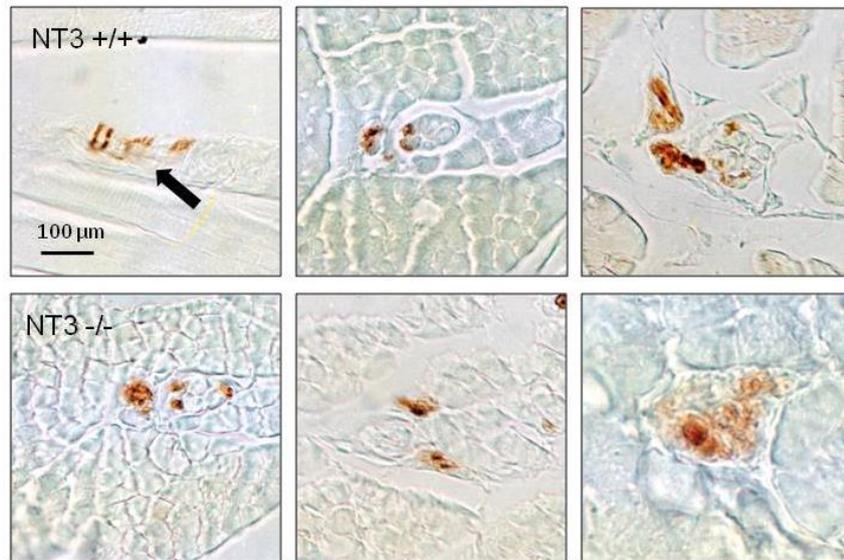


Figura 5.100.- Detección inmunohistoquímica de los neurofilamentos (fila superior) y la proteína S100 (fila inferior) en secciones del músculo masetero en ratones de 0 días.

En las secciones de músculos correspondientes a los animales deficientes en NT-3 también se han observado perfiles nerviosos, pero en ningún caso asociados a husos neuromusculares, lo que sugiere que puede tratarse de fibras nerviosas motrices destinadas a la inervación motriz de las fibras musculares.

Por lo que se refiere a los animales con mutaciones en el gen que codifica para TrkC se estudiaron exclusivamente a los 15 días de vida, que es el límite de supervivencia en los animales portadores de esta mutación. En los animales deficientes en TrkC no se observaron en ningún caso husos neuromusculares, mientras que en los animales wild-tipe y portadores de la mutación en heterozigosis, los husos neuromusculares presentaban una estructura, ultraestructura e inervación normales (**Figuras 5.101 y 5.102**), e idéntica a la que existe en otros músculos del cuerpo.

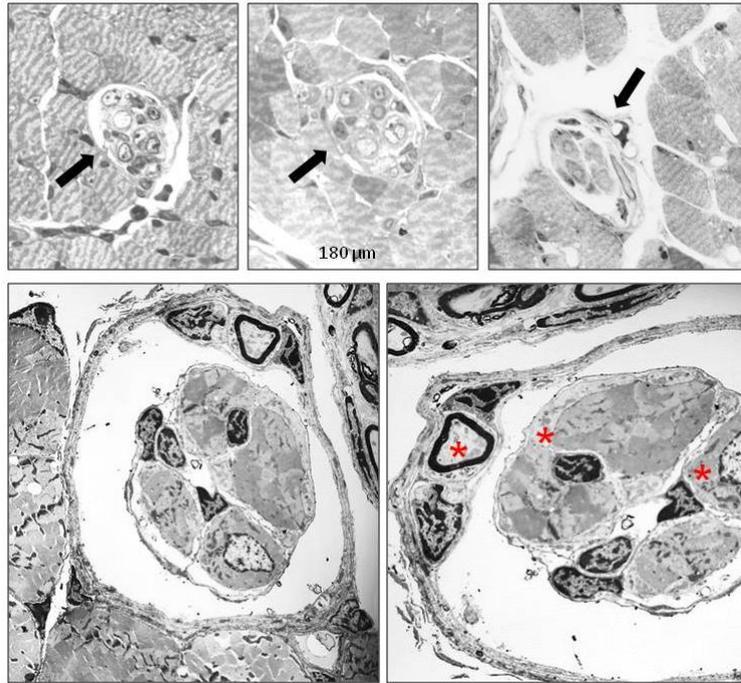


Figura 5.101.- Cortes semifinos transversales de husos neuromusculares del músculo masetero de ratón de 15 días de genotipo salvaje. En la parte inferior se observa un huso neuromuscular en sección transversal mostrando los diferentes componentes del mismo (magnificación original x5000) y un detalle de los nervios en la zona ecuatorial del huso (asteriscos).

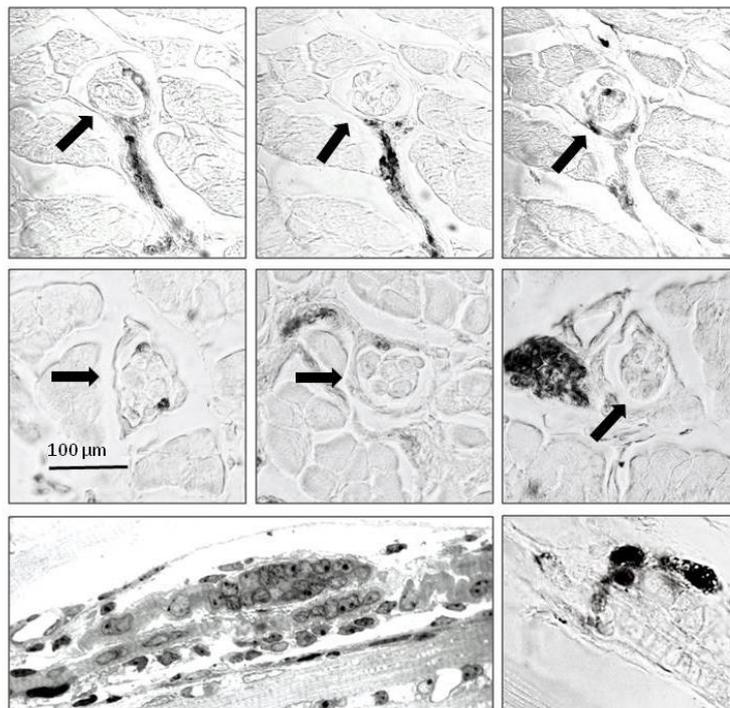


Figura 5.102.- Cortes seriados del músculo masetero de un ratón de 15 días de genotipo salvaje mostrando un huso neuromuscular procesados para la detección inmunohistoquímica de los neurofilamentos (imagen derecha de la fila superior) y la proteína S100. En la fila inferior se observa un huso neuromuscular en corte semifino mostrando las fibras intrafusales de cadena nuclear y saco nuclear, así como las fibras nerviosas que llegan a los extremos polares de estos propioceptores inmunomarcadas con anticuerpos anti proteína S100.

5.5. Inervación sensitiva de la cara

5.5.1. Formaciones sensitivas de la piel de la cara

Aunque generalmente se acepta que la inervación sensitiva de la cara es muy rica, en el presente estudio no se han logrado poner de manifiesto terminaciones sensitivas dérmicas diferenciadas como corpúsculos sensitivos (salvo en la piel del labio superior) ni en los cortes completos de la cara ni en las muestras de piel obtenidas a partir de material quirúrgico. El hecho de que si se hayan encontrado en las muestras de piel control (piel glabra digital) sugiere que las condiciones de preservación del material utilizado, o la sensibilidad de los anticuerpos en ellas no sea la más adecuada para la realización de este tipo de estudios.

En las muestras de piel procedentes de cadáveres se encontraron terminaciones nerviosas libres en la dermis cutánea de la mejilla, del labio superior y del párpado superior. Se trata de fibras nerviosas aisladas que en ningún caso llega a la epidermis (datos no mostrados).

En las muestras de piel quirúrgica de la mejilla la densidad de las fibras nerviosas observadas también fue muy baja, encontrándose terminaciones nerviosas aisladas y pequeñas formaciones corpusculares en la dermis, en relación con las glándulas sebáceas y sudoríparas. Por otro lado la densidad de células de Lanherhans fue muy variable y se localizaron en todos los estratos epidérmicos (**Figuras 5.103 y 5.104**).

Los únicos corpúsculos sensitivos con una morfología totalmente identificable fueron los corpúsculos de Meissner. Sólo se han encontrado en la piel del labio superior son de pequeño tamaño pero muestran la morfología típica y en ellos el axón es bien evidente (**Figura 5.104**).

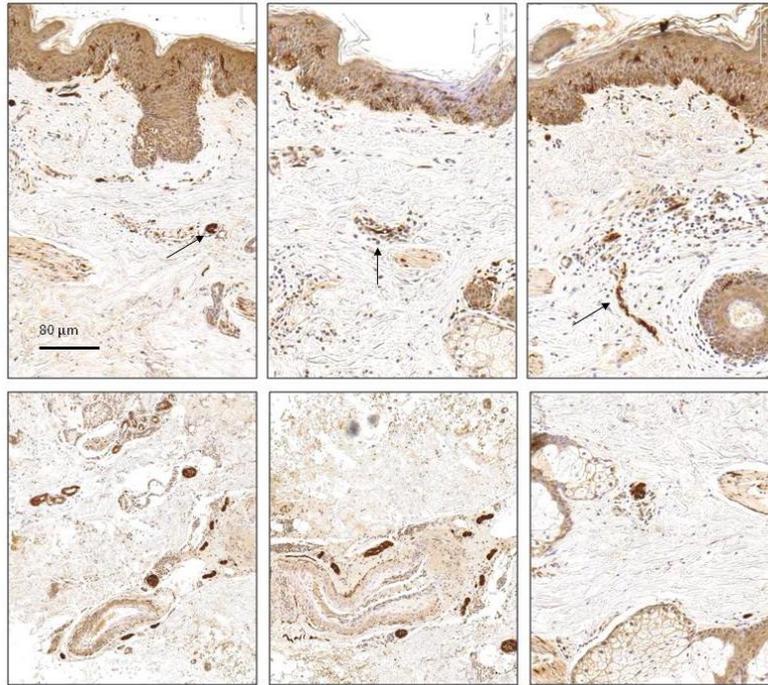


Figura 5.103.- Detección inmuhostoquímica de la proteína S100 en nervios dérmicos (flechas) y pequeñas formaciones corpusculares en la dermis de la piel de la mejilla. Los plexos nerviosos perivasculariales también presentan una intensa inmunorreacción para esta proteína.

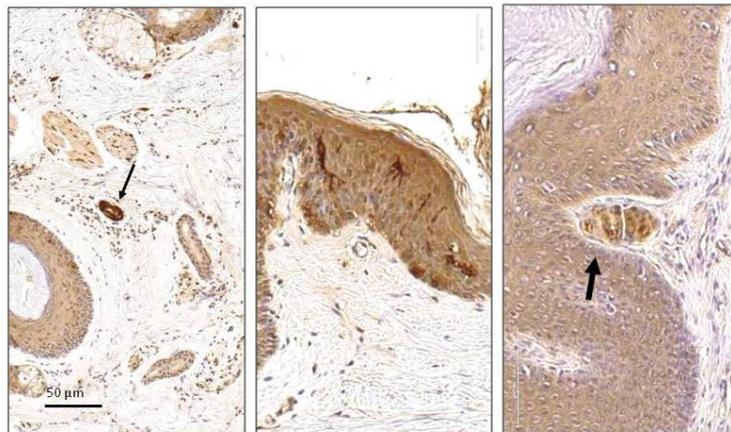


Figura 5.104.- Detección inmuhostoquímica de la proteína S100 en nervios dérmicos y pequeñas formaciones corpusculares (flecha) en la dermis de la piel de la mejilla. En la piel del labio superior se localizan corpúsculos de Meissner cuyos axones son inmunorreactivos para el neurofilamento.

5.5.1. Estructuras mecanosensitivas de la piel de la cara

Aunque los tratados clásicos de piel de anatomía y dermatología afirman que la piel de la cara posee diferentes morfopitos de mecanorreceptores en el presente estudio sólo se ha conseguido evidenciar la presencia de células de Merkel, escasos corpúsculos de Meissner y algunos corpúsculo de tipo Ruffini-like descritos en los párrafos anteriores. Y en alguno de ellos se ha detectado la

presencia de mecanoproteínas. En particular se ha detectado la presencia de Piezo2 (pero no de ASIC2 o de TRPV4) en las células de Merkel de la piel de la mejilla y del labio superior, pero no de ninguna otra región estudiada. La densidad de estas células varió considerablemente de unas zonas faciales a otras. La mayoría de las células de Merkel fueron Piezo2 positivas, pero también se observó una baja proporción de ellas que no expresan Piezo2 (**Figura 5.105**)

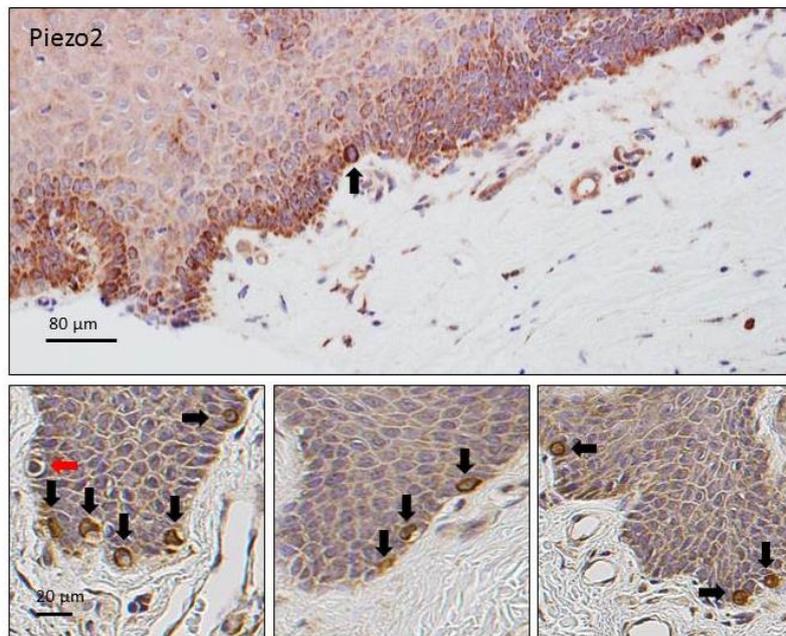


Figura 5.105.- Detección inmunohistoquímica de Piezo2 en la piel de la mejilla (fila superior) y en el borde cutáneo del labio superior (fila inferior). La mayoría de las células de Merkel son Piezo2 positivas (flechas negras) pero también hay algunas que son Piezo2 negativas (flecha roja).

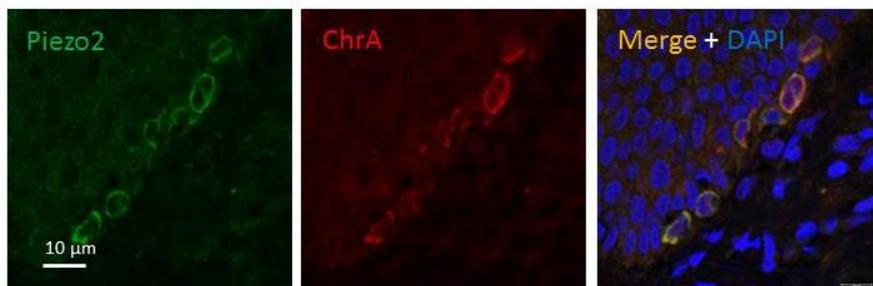


Figura 5.106.- Inmunofluorescencia para Piezo2, y cromogranina A en las células de Merkel de la mejilla. En la mayoría de ellas ambas proteínas se co-localizan.

Para confirmar que dichas células son células de Merkel, se ha utilizado el criterio de su morfología y localización dentro de la epidermis y la caracterización inmunohistoquímica. Las células de Merkel expresan

citoqueratina 20, cromogranina A y sinaptofisina. La mayoría de ellas expresan alguno de esos marcadores y con ellos se co-expresa el Piezo2 (**Figura 5.106**).

Por otro lado, y como era esperable en base a la función mecanorreceptora que realizan, las células Piezo2 positivas están en contacto con estructuras neurofilamento positivas que presumiblemente corresponden a axones de neuronas sensitivas mecanorreceptoras (**Figuras 5.107**).

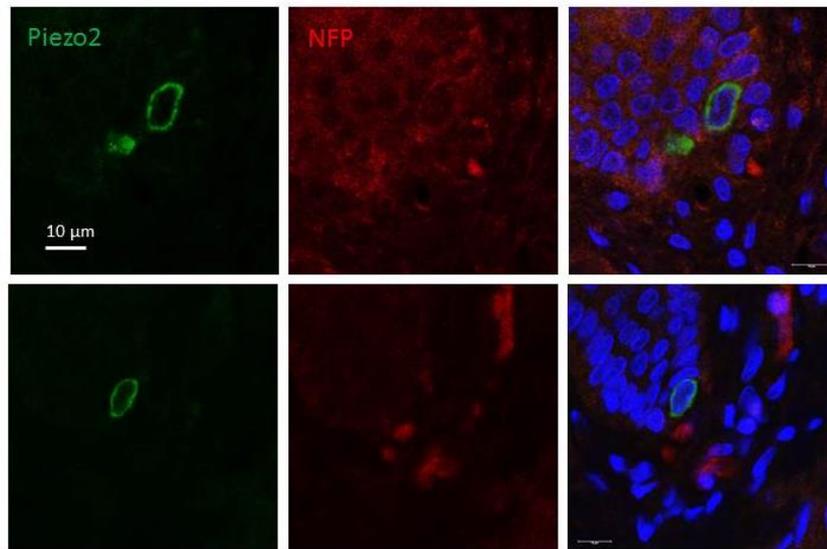


Figura 5.107.- Inmunofluorescencia para Piezo2, y neurofilamento en la piel de la mejilla. Las células de Merkel Piezo2 positivas están en aparente contacto con formaciones neurofilamento positivas (axones).

De todos los morfotipos de corpúsculos sensitivos que se han descrito en la cara, sólo se han encontrado corpúsculos de Meissner, de pequeño tamaño que expresan inmunorreacción para Piezo2 en sus axones (**Figura 108**). Las otras dos mecanoproteínas investigadas, ASIC2 y TRPV4, no se detectaron en ninguna formación sensitiva cutánea, pero si en las piezas controles de piel digital (datos no mostrados).

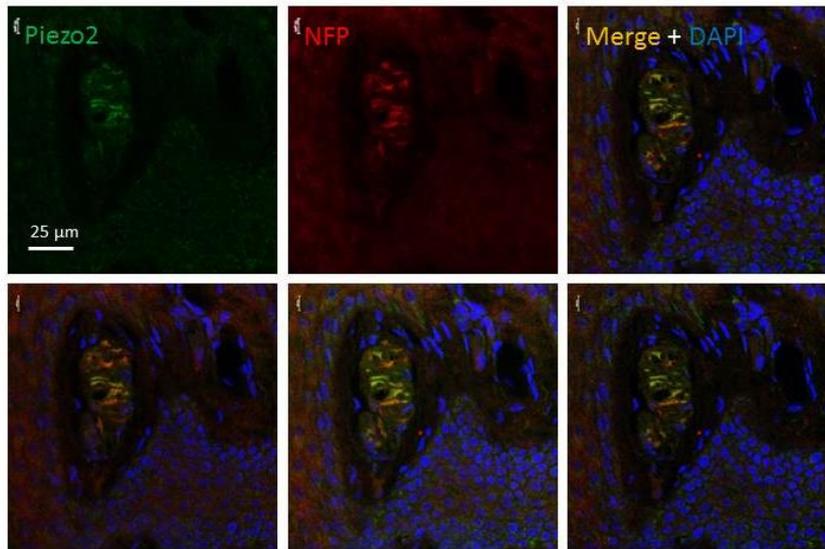


Figura 5.108.- Inmunofluorescencia para Piezo2 y neurofilamento en un corpúsculo de Meissner de la piel del labio superior. Ambas proteínas se localizan en el axón del corpúsculo. Las imágenes de la fila inferior corresponden a diferentes niveles de captura del microscopio laser confocal.

5.6. Estudio de los nervios faciales mediante resonancia magnética

Con la técnica de imagen utilizada, tal y como se observa en las imágenes, se han podido localizar los diferentes estratos histológicos de la cara, incluso los vasos faciales y los estratos músculo-aponeuróticos, pero en ningún caso se han identificado ramas de los nervios facial y trigémino.

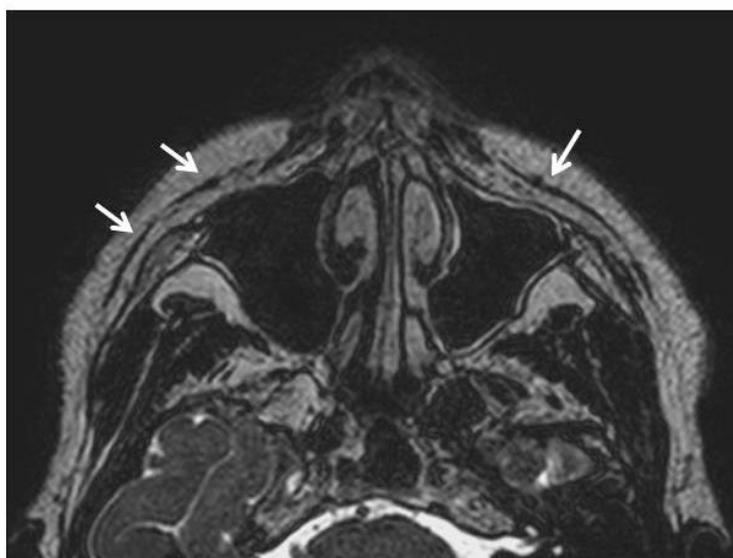


Figura 5.109.- Resonancia magnética de la cara. Las flechas indican los músculos faciales y el sistema músculo-aponeurótico superficial.

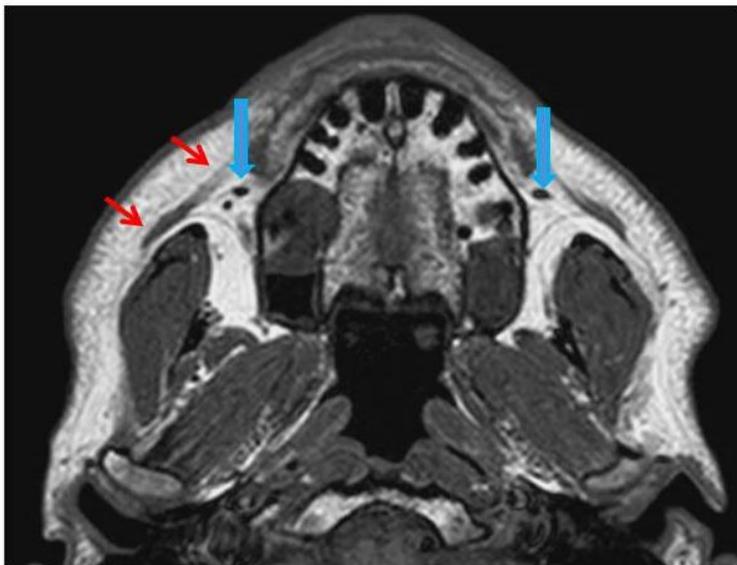
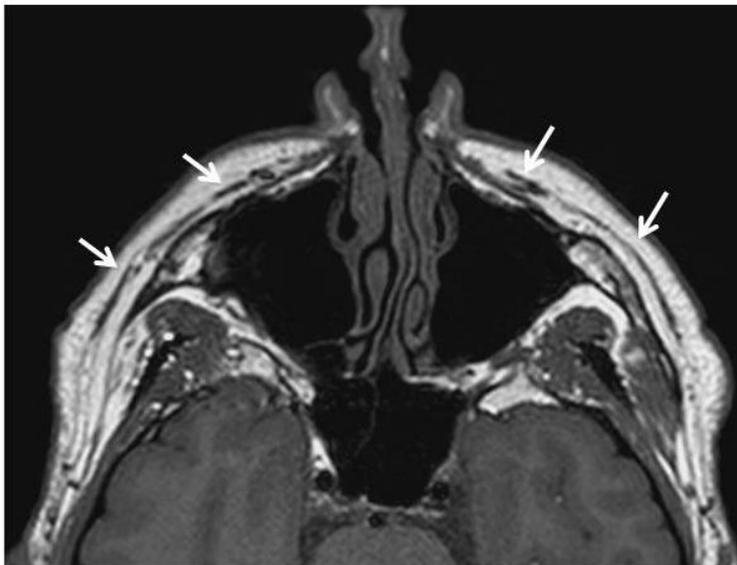
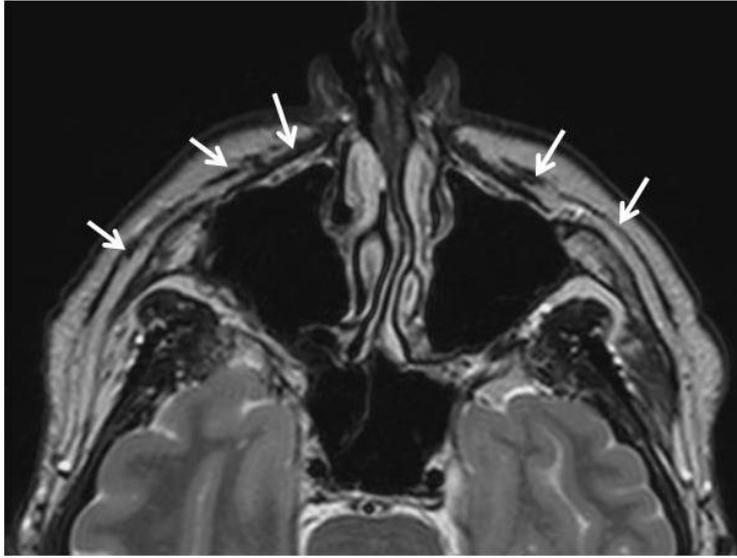


Figura 5.110 a 5.112.- Resonancia magnética de la cara. Las flechas indican los músculos faciales y el sistema musculo-aponeurótico superficial. Las flechas azules señalan los vasos faciales.

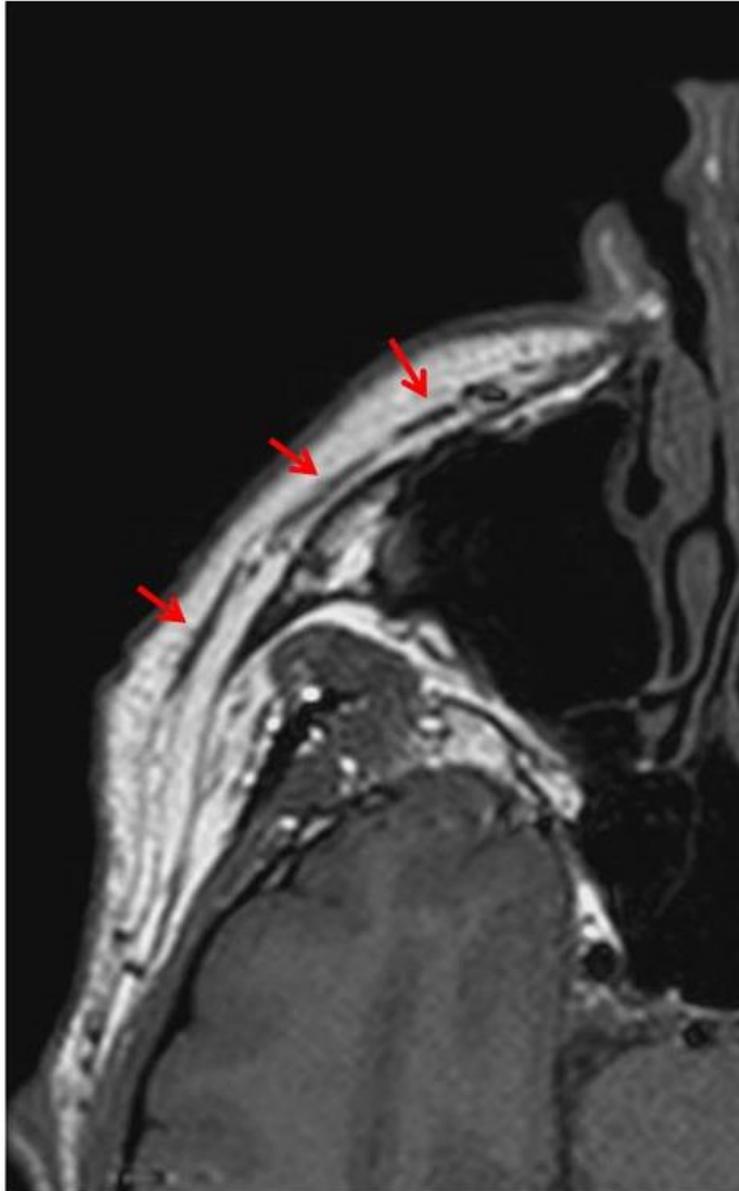


Figura 5.113.- Resonancia magnética de la cara. Las flechas indican los músculos faciales y el sistema musculo-aponeurótico superficial.

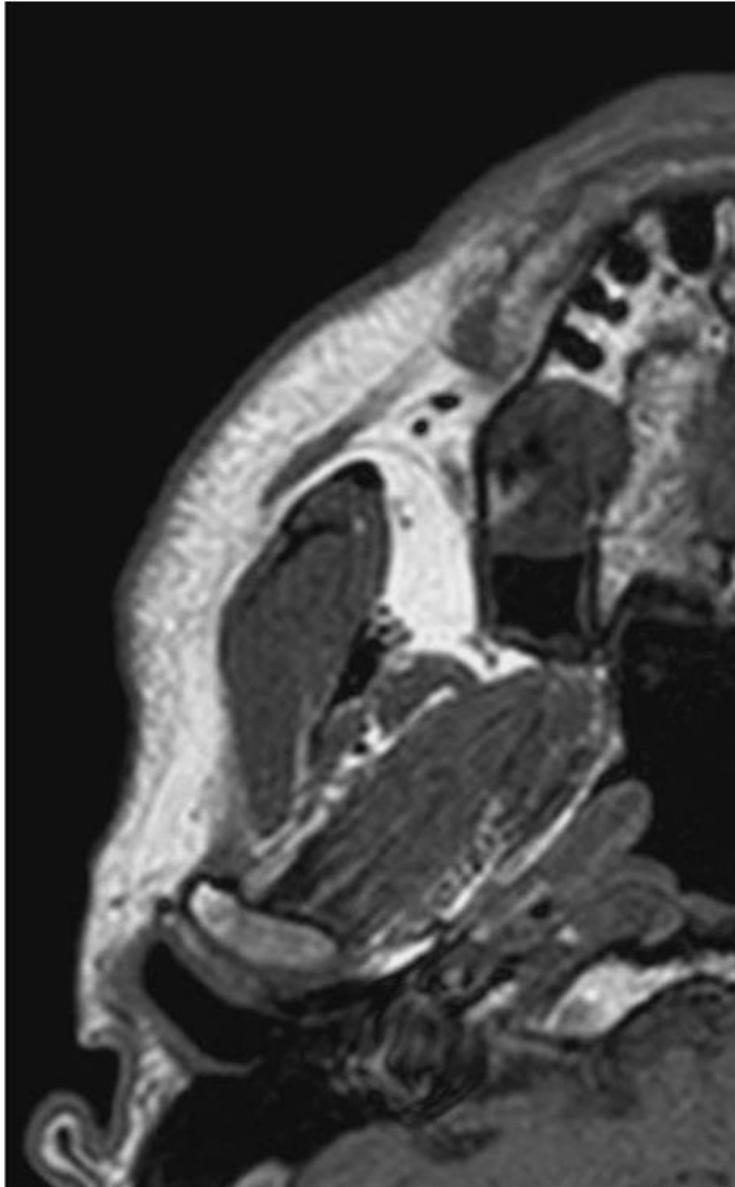


Figura 5.114.- Resonancia magnética de la cara. Las flechas indican los músculos faciales y el sistema musculo-aponeurótico superficial.

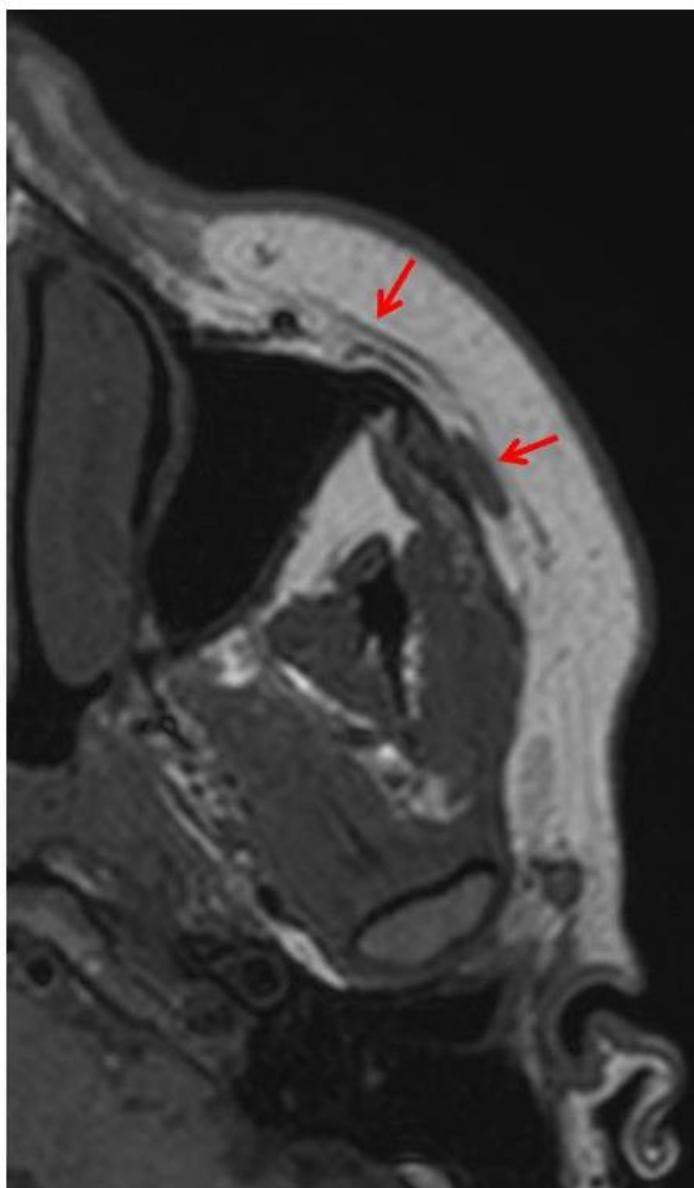


Figura 5.115.- Resonancia magnética de la cara. Las flechas indican los músculos faciales y el sistema musculo-aponeurótico superficial.

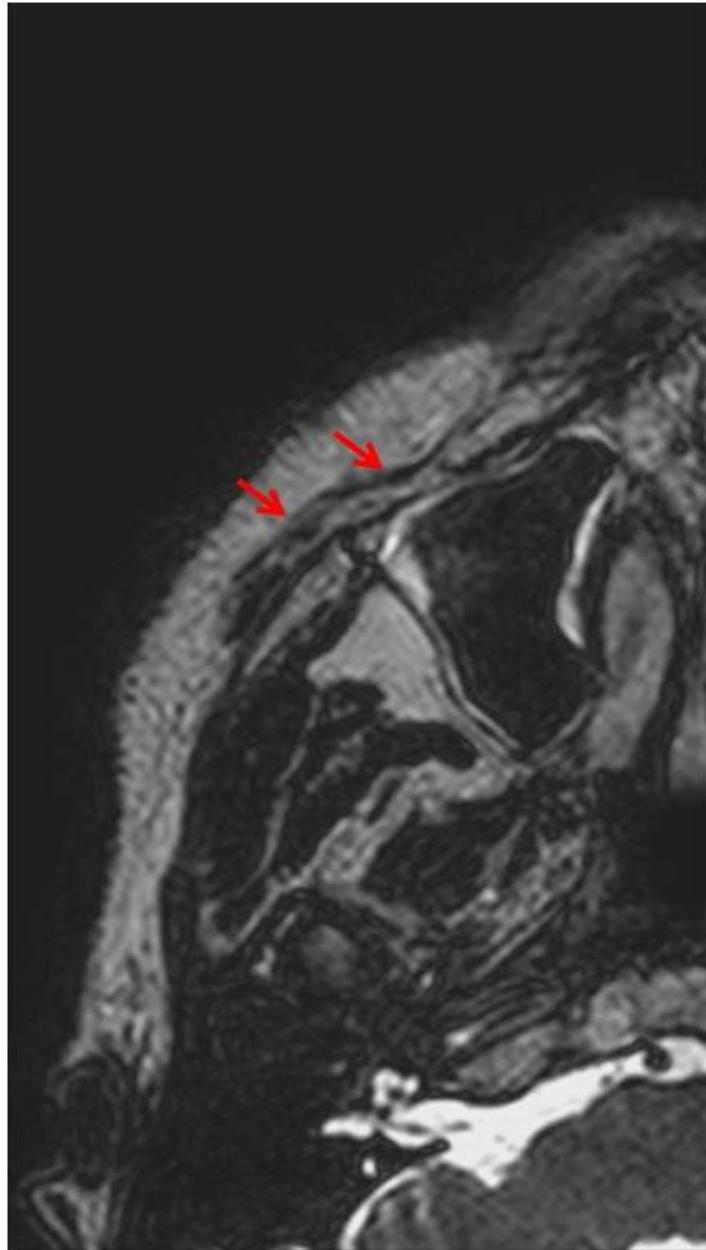


Figura 5.116.- Resonancia magnética de la cara. Las flechas indican los músculos faciales y el sistema musculo-aponeurótico superficial.

6. Discussion

6. Discusión

6.1. Consideraciones generales

El presente trabajo de Tesis Docoral se realizó para analizar diferentes aspectos de la inervación de la cara, en sus componentes motor y sensitivo, así como para establecer las relaciones de los nervios facial y trigémino (sus ramas superficiales), con los planos histológicos de la cara y las comunicaciones entre ambos. Además, se aportan nuevos datos sobre la propiocepción en los músculos faciales, el desarrollo de los husos neuromusculares en los músculos masticadores y acerca de la inervación mecanosensitiva de la piel de la cara. Por último, se ha investigado la anatomía de los nervios facial y trigémino mediante resonancia magnética.

6.2. La estructura histológica de la cara: ¿existe realmente un SMAS continuo?

La existencia del sistema músculo-aponeurótico superficial de la cara, entendido como un *continuum* a lo largo de todas las regiones cefálicas es aceptado por algunos (Mendelson y Jacobson, 2008; Kahn y Bagueri, 2014), negado por otros y aceptado sólo en algunas regiones de la cara por un tercer grupo de investigadores (McKinney y Gottlieb, 1985; Gardetto et al., 2002). No falta incluso quienes piensan que existe un sistema superficial y otro profundo (Rees y Aston, 1977; Owsley, 1983). La disección del SMAS de la cara se realizó sobre cadáveres fijados, y ello ha hecho que no se pueda realizar la separación por planos de de una forma correcta. En la mayoría de los casos resultó imposible aislar las ramas del nervio facial y mantener al mismo tiempo los planos aponeuróticos de la cara. Por ello se recurrió a las secciones histológicas con el fin de establecer la disposición de los diferentes planos histológicos de la cara y la relación de los nervios de la cara con ellos.

En los últimos años se han realizado una serie de estudios microscópicos (Pensler et al., 1985; Thaller et al., 1990; Har-Shai et al., 1997; Gardetto et al., 2002; Ghassemi et al., 2003; Huggins et al., 2007) que han demostrado la organización general del SMAS así como su histología (Barton, 1992; Gosain et al., 1993). Pero ha sido los estudios de Macchi et al. (2007a,b, 2010) los que han analizado con mayor detalle la estructura regional de las partes blandas de las diferentes regiones de la cara, y en consecuencia también del SMAS. En nuestro trabajo hemos seguido el esquema propuesto por estos autores.

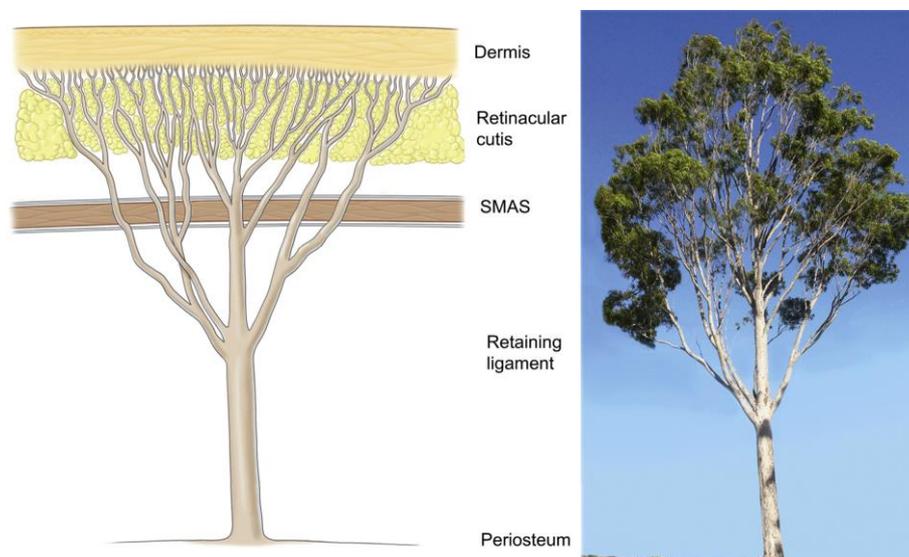


Figura 6.1.- Esquema ideal del SMAS. Tomado de Kanh y Bagheri (2014)

Según el esquema ideal de la disposición del SMAS que se representa en la **figura 6.1**, el sistema de anclaje de la piel al periostio y a los planos profundos de la cara es cada vez más robusto de superficie a profundidad. En nuestro estudio no ha podido conformarse este extremo ya que la disección se realizó sobre material cadavérico fijado que no consiente identificar todas las estructuras.

Pero además, en base a los resultados obtenidos, consideramos que no se puede generalizar ese esquema ya que tanto la estructuración en planos de las partes

blandas superficiales craneocefálicas como el espesor relativo de cada una de ellas varia de unas zonas a otras. Además, según los resultados del estudio morfométrico realizado no el espesor de los tabiques verticales y horizontales del tejido fibroadiposo no guardan relación con la profundidad y no confluyen en ligamentos retenedores. Esas situaciones se producen exclusivamente en los puntos de anclaje más evidentes.

6.3. Los nervios facial y trigémino tienen ramas superficiales y profundas al SMAS

Tanto las ramas del facial como las superficiales del trigemino guardan estrechas relaciones con el SMAS, considerándose que el facial está en profundidad respecto a él, y el trigémino más superficial.

En cuanto a los patrones de ramificación del nervio facial, en nuestro trabajo hemos observado que predominan los de tipo II (6/10), lo cual difiere claramente de las observaciones de Ekinci, 1999; Manur et al., 2014; Vacher et al. 2015; Gataa y Faris, 2016; Wildan y Nasser, 2016). Estas discrepancias posiblemente haya que buscarlas en razones étnicas, pero hasta la fecha este asunto aun no ha podido aclararse. Lo que si ha sido evidente es que en todos los casos se han podido individuar todas las ramas del nervio facial.

En cuanto a la disposición de los ramos más periféricos de los nervios facial y trigémino los resultados obtenidos demuestran que existen amplias variaciones regionales en cuanto a su localización. En términos generales los de mayor diámetro son profundos, pero los de tamaño intermedio y fino se disponen de forma indistinta en los diferentes planos de la cara. Por tanto, cualquier actuación quirúrgica sobre la cara, incluso las manipulaciones no invasivas del tipo de la inyección de botox o de ácido hialurónico, deben de tener siempre en

consideración la presencia de pequeños ramos nerviosos para tratar de lesionarlos.

6.4. Las comunicaciones trigémino-faciales

Desde que se postuló que la propiocepción de los músculos faciales podía depender del nervio trigémino, los estudios sobre las uniones entre ambos nervios (que ya habían sido documentadas en trabajos clásicos; ver Diamond et al., 2011) conicieron un gran auge. (May, 2000; Li et al., 2009; Diamond et al., 2011; Shoja et al., 2014). El excelente trabajo de Hwang et al. (2015) ha puesto de manifiesto que cuando se estudian las unions trigémino-faciales en cadaveres los porcentajes de las diferentes ramas son altos (95.0%±8.0% con ramos del maxilar superior; 76.7%±38.5% con ramos del mandibular; 33.8%±19.5% con ramos del oftálmico (**Figura 6.1**). Pero cuando se realiza previamente impregnación de los nervios mediante la técnica de Sihler's se encontraron unions en el 100% de los casos entre el facial y ramos del maxilar y del mandibular, y hasta un 85.7% con ramas del oftálmico (Yan et al., 2013).

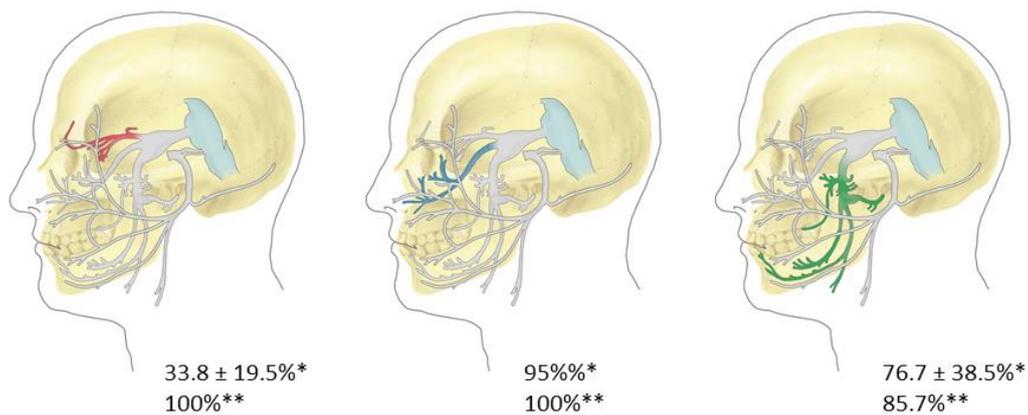


Figura 6.1.- Porcentajes de uniones entre las diferentes ramas del trigémino con el nervio facial demostradas por técnicas de disección (*) o mediante técnicas de impregnación argéntica (**). Tomada de Cobo et al. (aceptado para publicación; Anexo 2)

Nosotros hemos observado uniones entre el ramo zigomático del facial y el nervio infraorbitario, y entre el nervio marginal mandibular del facial y el nervio mentoniano que, como afirman todos los autores consultados, se dan en el 100% de los casos (Hawang et al., 2004; Hu et al., 2007; Diamond et al., 2011; Hwang et al., 2015). No hemos observado otras uniones del tipo de las que se han descrito en la literatura por diferentes autores (ver Estado Actual del Problema, Sección 2.4; **Figura 6.2**). Posiblemente las condiciones de los cadáveres no eran las mejores para realizar este tipo de estudios y queda, por tanto, pendiente revisar el tema.

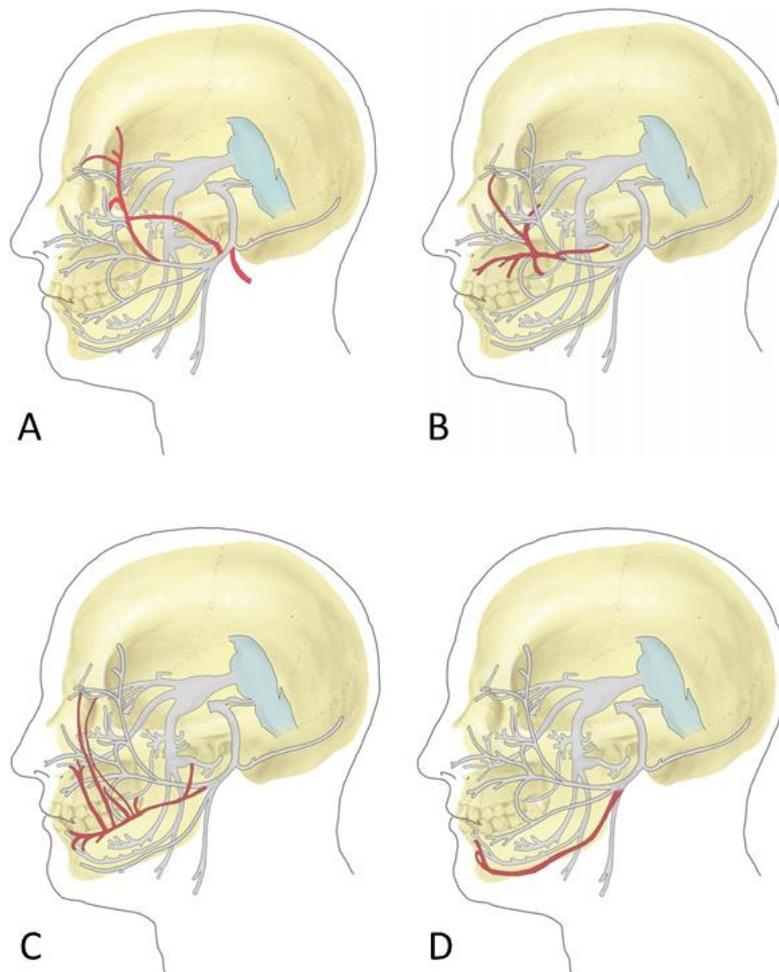


Figura 6.3.- Uniones descritas en la bibliografía entre los nervios trigémino y facial. Tomada de Cobo et al. (aceptado para publicación; Anexo 2)

Sobre la base de los datos existentes en la bibliografía, y nuestras propias observaciones, acerca de las uniones entre las ramas de los nervios facial y trigémino hemos elaborado una tabla en la que se establece a través de qué ramas del trigémino se recoge la propiocepción de los músculos faciales.

Conexiones del trigémino con	Ramas del nervio facial	Músculos inervados por el facial
auriculotemporal auricular mayor	Tronco del facial Divisiones temporofacial and cervicofacial	
zygomaticotemporal supraorbital auriculotemporal	Temporal	fontalis procerus depressor supercilii corrugator supercilii orbicularis oculi
supraorbital supratroclear buccinators buccal zygomaticofacial auriculotemporal	Zigomático	orbicularis oculi zygomaticus major zygomaticus minor levator labii superioris aleque nasi levator anguli oris
infratrochlear infraorbital buccal mental bucinator zygomaticofacial auriculotemporal	Bucal	orbicularis oculi zygomaticus major zygomaticus minor levator labii superioris aleque nasi levator anguli oris buccinators risorius
buccinator mental	Marginal mandibular	orbicularis oris depressor anguli oris depressor labii inferioris mentalis
	Cervical	platysma

En términos generales las ramas de los del nervio oftálmico se unen a la rama temporal del facial (o al tronco y división primaria del mismo) la cual se distribuye por los músculos faciales situados en torno a la comisura de los párpados; los ramos procedentes del nervio maxilar aportan conexiones a los nervios zigomático y bucal, que se distribuyen por los músculos relacionados con la comisura labial; y las ramas del nervio mandibular se conectan con los nervios marginal mandibular y cervical para distribuirse por músculos próximos al mentón y al platysma coli. Aunque estos datos deben de ser tomados con

precaución parece que existe un paralelismo topográfico entre la situación de los músculos faciales y las ramas del trigémino que en principio vehiculan su propiocepción.

La significación de estas conexiones y uniones entre los nervios facial y trigémino aun no está del todo aclarada. Ya hace tiempo que Baumel (1974) y Last (1976) sugirieron que sirvan para que los impulsos nociceptivos de los músculos faciales sean conducidos al sistema nervio central a través del nervio trigémino. De la misma opinión son autores más recientes (Lazarov, 2007; Cattaneo y Pavesi, 2014). Pero en los animales de experimentación no se ha podido demostrar aferencia de los músculos faciales al núcleo mesencefálico del trigémino (que es donde se localizan las neuronas propioceptivas de los músculos masticadores) por lo que el problema permanece sin resolver.

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.

6.5. Alternativas a los husos neuromusculares en los músculos faciales: propioceptores de los músculos faciales

Como se expuso claramente en el capítulo de introducción, 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 (Stal 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 asumirse que se trata de las fibras sensitivas propioceptoras. En nuestro estudio hemos localizado una subpoblaciones de fibras Piezo2 y ASIC2 positivas, pero no 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 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, propioceptoras 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 usos 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. No obstante, en todos los músculos faciales analizados se han encontrado abundantes perfiles nerviosos 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 revisar 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). Además, 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 que existen en 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).

6.6. El sistema NT-3/TrkC regula el desarrollo de los músculos masticadores

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 sí 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.

6.7. Mecanorreceptores en la piel facial: más moleculares que morfológicos

El conocimiento acerca del funcionamiento de los corpúsculos sensitivos ha experimentado un notable interés desde que se conoce que los canales iónicos son claves para la detección de todas las modalidades sensoriales y en particular para la mecanosensación y mecanotransducción (conversión de un estímulo mecánico en una señal eléctrica transmitida por las neuronas). Al principio se pensó que cada modalidad sensorial estaba asociada a un tipo de canal iónico, y debería de expresarse exclusivamente en las neuronas y formaciones sensitivas relacionadas con ella. Pero en la actualidad este principio ya no mantiene (Belmonte y Viana, 2008).

Por ejemplo, en los corpúsculos de Meissner, que son morfológica y funcionalmente mecanorreceptores, además de canales iónicos mecanosensores, contienen otros relacionados con la termocepción y la

nocicepción; esta combinación de canales en la misma estructura sensorial puede estar en la base de la multifuncionalidad de los corpúsculos de Meissner planteada por algunos autores (Paré et al., 2001; Vega et al., 2012). Así, pues, aunque la función mecanorreceptora de los corpúsculos de Meissner y Pacini está bien establecida las bases moleculares de la misma solo han comenzado a conocerse en los últimos años. La presencia en los corpúsculos sensitivos de diferentes canales iónicos sugiere que están en la base de la mecanotransducción o al menos son necesarios para ella (ver Del Valle et al., 2012).

En nuestro trabajo, a diferencia de lo que afirman algunos autores (ver Siemionov et al., 2007), se han encontrado muy pocos corpúsculos sensitivos diferenciados y se corresponden con corpúsculos de tipo Meissner-like, situados en la piel que recubre el labio superior. Es importante destacar que en los corpúsculos de Meissner el axón expresa inmunorreacción para Piezo 2, lo cual demuestra de forma definitiva que se trata de axones mecanorreceptores, y confirma los resultados obtenidos con otros canales iónicos (Cabo et al., 2015; Alonso-González et al., 2016). En la dermis de la piel de la mejilla ocasionalmente se observaron corpúsculos Ruffini-like pero nunca corpúsculos de tipo Pacini o formaciones sensitivas en relación con los pelos. Nuestros hallazgos difieren de las observaciones de Nolano y Cols. (2013) que observaron diferentes morfotipos de corpúsculos así como formaciones sensitivas asociadas a los pelos en material humano fresco del borde cutáneo-mucoso de los labios. Posiblemente el tratamiento del material utilizado y la sobrefijación de las piezas utilizadas en el estudio sean la causa de estos resultados discordantes. Están en marcha en nuestro laboratorio estudios sobre material no fijado y fresco para confirmar o no la existencia de terminaciones nerviosas, de diferentes características, en la piel facial humana.

Lo que si se ha logrado poner en evidencia es la existencia de algunas células de Merkel en al piel de la mejilla y del labio superior. Muy recientemente se han identificado, clonado y caracterizado una familia de canales iónicos denominado Piezo que son los únicos que hasta la fecha cumplen todos los requisitos para ser considerados mecanoproteínas, es decir, que su activación lleva a mecanotransducción. La localización de Piezo 2 en las células de Merkel humanas es la primera vez que se demuestra. En general nuestros hallazgos concuerdan con los resultados previos en ratón (Ranade et al., 2014) y la expresión de Piezo2 por parte de las células de Merkel es uno de los criterios asentados en los últimos años por lo que se puede afirmar que las células de Merkel son realmente mecanorreceptores (Woo et al., 2014, 2015). Las células de Merkel se encuentran en la piel de todos los vertebrados y están asociados con fibras A β formando complejos que actúan como mecanorreceptores de adaptación lenta (Boulais y Misery, 2007).

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.

6.8. Aun no es posible hacer una anatomía por la imagen de los nervios facial y trigémino

Uno de los objetivos que nos habíamos propuesto fue tratar de identificar las ramas periféricas de los nervios trigémino y facial mediante resonancia magnética en la cara. Existe una muy abundante bibliografía sobre el tema, pero en ningún caso se han encontrado datos sobre las partes de la cabeza que se han explorado en esta tesis. En las imágenes que hemos investigado nunca se

han podido visualizar los troncos nerviosos, por lo que este importante capítulo queda aun pendiente de resolver. El perfeccionamiento de las técnicas de imagen, en especial los escáner CT volumétricos y los escáner de RM de amplio campo, así como la mayor resolución de las secuencias de RM, las imágenes volumétricas 3D, contribuirán al desarrollo de las imágenes de los pares craneales (ver Borges y Casselman, 2007).

6.9. Limitaciones del estudio

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 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.

6.10. Consideraciones prácticas y perspectiva de futuro

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 - Concluding remarks

7. Conclusiones

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

- 1.- El sistema musculo-aponeurótico superficial de la cara es bien identificable sólo en la región masetérico-parotídea. En las zonas de la mejilla y surco nasolabial, aunque es diferenciable histológicamente, no representa una entidad estructural continua; en las regiones temporal, de la ceja y mentoniana, no es diferenciable histológicamente aunque se preserva la estratigrafía de las paredes de la cara. No se han encontrado evidencias del sistema musculo-aponeurótico superficial ni en el párpado superior ni en el labio superior.
- 2.- El espesor de los estratos histológicos de las diferentes regiones de la cara analizadas, así como el grosor de los tabiques de los estratos fibroadiposos superficial y profundo, no es homogéneo.
- 3.- En nuestra serie, el tipo predominante de ramificación del nervio facial fue el II de Davies (60%), seguido del tipo IV (30%) y el tipo V (10%).
- 4.- Las ramas periféricas de los nervios facial y trigémino muestran uniones constantes entre los ramos infraorbitario del trigémino y bucal del facial, así como entre el ramo mentoniano del trigémino y el marginal mandibular del facial. Mediante disección no se han identificado otras uniones entre ambos nervios.
- 5.- Los nervios de la cara se localizan en todos los estratos histológicos de la misma, y su densidad y tamaño varía según las regiones estudiadas. Con carácter general, los perfiles nerviosos de mayor diámetro se encuentran

profundos en las paredes de la cara y los de menos diámetro son superficiales.

- 6.- Los músculos cráneofaciales inervados por el nervio trigémino presentan husos neuromusculares típicos mientras que los inervados por el facial carecen de ellos. No obstante, en estos músculos se ha identificado un aparato nervioso muy desarrollado y se ha demostrado la existencia de formaciones nerviosas sensitivas que por su morfología y propiedades inmunohistoquímicas pueden ser consideradas como mecanorreceptores-propioceptores. La densidad de estas formaciones es variable en los músculos de la cara siendo máxima en los músculos bucal y orbiculares y mínima en los músculos zigomáticos.
- 7.- El desarrollo de los husos neuromusculares en los músculos cráneofaciales del ratón está regulado por el sistema de neurotrofinas neurotrofina-3/TrkC.
- 8.- En el material cadavérico utilizado en nuestro trabajo no fue posible identificar terminaciones nerviosas libres o formaciones nerviosas corpusculares en la dermis de la piel de la cara, ni independientes ni asociadas a los pelos; ocasionalmente se han observado corpúsculos de Meissner-like. Sin embargo, en las muestras quirúrgicas de piel de la mejilla se identificaron células de Merkel con propiedades mecanosensoras.
- 8.- Al nivel de resolución de las técnicas de imagen actuales resulta imposible identificar las ramas periféricas de los nervios trigémino y facial dentro del espesor de las paredes de la cara. Sin embargo, sí que consienten identificar las estructuras de los planos musculo-aponeuroticos faciales.

7. Concluding remarks

After a detailed analysis of the Results and the proper discussion of such, the following conclusions were reached

1. - The superficial musculo-aponeurotic system of the face is well identifiable only in the maseletic-parotid region. In the cheek and nasolabial fold zones, although it can be distinguished histologically, does not present a continuous structural organization; in the temporal, of the eyebrow and mentoniana regions, it is not distinguished histologically although the stratigraphy of the face walls is preserved. Evidence of a superficial musculo-aponeurotic system was found neither in the superior eyelid nor in the superior lip.
2. - The thickness of the histologic layers in the different facial regions analyzed, as well as the thickness of the fibrous septa of the superficial and deep fibroadipous layers, is not homogenous.
3. - In our series, the predominant type of facial nerve branching was the II type of Davies (60%), followed of type IV (30%) and type V (10%).
4. - The peripheral branches of the facial and trigeminal nerves show constant unions between the trigeminal infraorbital branch and the facial buccal branch, as well as between the trigeminal mentonian branch and the facial marginal mandibular branch. Using dissection other unions between both nerves have not been identified.
5. - Nerves can be identified in all the histologic layer of the face, and its density and size vary according to the studied regions. As a rule, the nerve profiles

of greater diameter are deep in the walls of the face and those displaying a less diameter are superficial.

6. - The craniofacial muscles innervated by the trigeminal nerve present/display typical muscle spindles whereas those innervated by the facial nerve lack them. However, in these muscles a very developed nervous apparatus has been identified. Moreover the presence of sensory nerve formations has been demonstrated, which on the basis of their immunohistochemical properties and morphology can be regarded as mechanoreceptors-proprioceptors. The density of these formations varies among facial muscles, being maximal in the buccal and orbicularis muscles, and minimal in the zygomatic ones.
7. - The development of the muscle spindles in the mouse craniofacial muscles is regulated by the system of neurotrofinas neurotrofina-3/TrkC.
8. - In the cadaveric material used herein it was not possible to identify free nerve endings or corpuscular sensory nerve formations in the dermis of the skin of the face, neither independent nor associated to the hairs; occasionally Meissner-like corpuscles have been observed. Nevertheless, in the cutaneous surgical samples of the cheek Merkel cells with mechanosensory properties were identified.
- 8.- At the actual level of resolution of the image techniques it is impossible to identify the peripheral branches of the trigeminal and facial nerves within the thickness of the walls of the face. Nevertheless, they allow identifying the structures of the face musculo-aponeurotic planes.

8. Bibliografía

8. Bibliografía

- Abraira VE, Ginty DD. The sensory neurons of touch. *Neuron* 2013; 79:618-39.
- Abul-Hussan HS, von Drasek Ascher G, Acland RD. Surgical anatomy and blood supply of the fascial layers of the temporal region. *Plast Reconstr Surg* 1986; 77:17-28.
- Accioli de Vasconcellos JJ, Britto JA, Henin D, Vacher C. The fascial planes of the temple and face: an en-bloc anatomical study and a plea for consistency. *Br J Plast Surg* 2003; 56:623-9.
- Alghoul M, Bitik O, McBride J, Zins JE. Relationship of the zygomatic facial nerve to the retaining ligaments of the face: the Sub-SMAS danger zone. *Plast Reconstr Surg*. 2013; 131:245e-252e.
- Alghoul M, Codner MA. Retaining ligaments of the face: review of anatomy and clinical applications. *Aesthet Surg J*. 2013; 33:769-82.
- Alonso-González P, Cabo R, San José I, Gago A, Suazo IC, García-Suárez O, Cobo J, Veja JA. Human digital Meissner corpuscles display immunoreactivity for the multifunctional ion channels TRPC6 and TRPV4. *Anat Rec (Hoboken)*2016; en prensa
- Ammirati M, Spallone A, Ma J, Cheatham M, Becker D. An anatomicomicrosurgical study of the temporal branch of the facial nerve. *Neurosurgery* 1993; 33:1038-43.
- 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.
- Arda O, Göksügür N, Tüzün Y. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clin Dermatol*. 2014; 32:3-13.
- Arnadottir J, Chalfie M. Eukaryotic mechanosensitive channels. *Annu Rev Biophys*. 2010; 39:111-137.
- Banks RW. The innervation of the muscle spindle: a personal history. *J Anat*. 2015; 227:115-35.

- Barbacid M. Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 1995; 7: 148-55.
- Barton FE Jr. The SMAS and the nasolabial fold. *Plast Reconstr Surg* 1992; 89: 1054-57.
- Baumel J. Trigeminal-facial nerve communications. *Arch Otolaryngol* 1974; 99: 34-44.
- Bernstein L, Nelson RH. Surgical anatomy of the extraparotid distribution of the facial nerve. *Arch Otolaryngol.* 1984; 110:177-83.
- Bewick GS, Banks RW. Mechanotransduction in the muscle spindle. *Pflugers Arch.* 2015; 467:175-90.
- Borges A, Casselman J. Imaging the trigeminal nerve. *Eur J Radiol.* 2010; 74: 323-340.
- Bowden RE, Mahran ZY. Experimental and histological studies of the extrapetrous portion of the facial nerve and its communications with the trigeminal nerve in the rabbit. *J Anat.* 1960; 94: 375-86.
- Broughton M, Fyfe GM. The Superficial Musculoaponeurotic System of the Face: A Model Explored. *Anat Res Int.* 2013; 2013, Article ID 794682, 5 pages; doi: 10.1155/2013/794682
- Butler AA, Héroux ME, Gandevia SC. Body ownership and a new proprioceptive role for muscle spindles. *Acta Physiol (Oxf)* 2016; doi: 10.1111/apha.12792
- Cabo R, Gálvez MA, San José I, Laurà R, López-Muñiz A, García-Suárez O, Cobo T, Insausti R, Vega JA. Immunohistochemical localization of acid-sensing ion channel 2 (ASIC2) in cutaneous Meissner and Pacinian corpuscles of *Macaca fascicularis*. *Neurosci Lett.* 2012; 516:197-201.
- Cabo R, Alonso P, Viña E, Vázquez G, Gago A, Feito J, Pérez-Moltó FJ, García-Suárez O, Vega JA. ASIC2 is present in human mechanosensory neurons of the dorsal root ganglia and in mechanoreceptors of the glabrous skin. *Histochem Cell Biol* 2015; 143:267-76.

- Cabo R, Gálvez A, Laurà R, San José I, Pastor JF, López-Muñiz A, García-Suárez O, Vega JA. Immunohistochemical Detection of the Putative Mechanoproteins ASIC2 and TRPV4 in Avian Herbst Sensory Corpuscles. *Anat Rec.* 2013; 296:117-22.
- Calavia MG, Montañó JA, García-Suárez O, Feito J, Guervós MA, Germanà A, Del Valle M, Pérez-Piñera P, Cobo J, Vega JA. Differential localization of Acid-sensing ion channels 1 and 2 in human cutaneous Pacinian corpuscles. *Cell Mol Neurobiol.* 2010; 30:841-8.
- Cattaneo L, Pavesi G. The facial motor system. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014; 38:135-59.
- Chen HH, Frank E. Development and specification of muscle sensory neurons. *Curr Opin Neurobiol.* 1999;9:405-9.
- Chen HH, Hippenmeyer S, Arber S, Frank E. Development of the monosynaptic stretch reflex circuit. *Curr Opin Neurobiol.* 2003; 13:96-102.
- Cheng NC, Liao SL, Wang IJ, Lin IC, Tang YB. Fiber type and myosin heavy chain compositions of adult pretarsal orbicularis oculi muscle. *J Mol Histol.* 2007; 38: 177-82.
- Chow S, Bennett RG. Superficial Head and Neck Anatomy for Dermatologic Surgery: Critical Concepts. *Dermatol Surg.* 2015; 41 Suppl 10:S169-77.
- Collins DF, Refshauge KM, Todd G, Gandevia SC. Cutaneous receptors contribute to kinesthesia at the index finger, elbow, and knee. *J Neurophysiol.* 2005; 94:1699-706.
- Commander SJ, Chang D, Fakhro A, Nigro MG, Lee EI. Noninvasive Facial Rejuvenation. Part 1: Patient-Directed. *Semin Plast Surg* 2016; 30:129-33.
- 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, Dubin AE, Patapoutian A. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 2010; 330:55-60.
- Dauber W. Feneis. *Nomenclatura Anatómica Ilustrada*. 5ª Ed. Elsevier.-Masson. Barcelona. 2007.
- Davis RA, Anson BJ, Budinger JM, Kurth IE. 1956 Surgical anatomy of the facial nerve and parotid gland based upon a study of 350 cervicofacial halves. *Surg Gynecol Obstet*. 1956; 102: 385-412.
- D'Andrea E, Barbaix E. Anatomic research on the perioral muscles, functional matrix of the maxillary and mandibular bones. *Surg Radiol Anat*. 2006; 28: 261-6.
- 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.
- Del Valle ME, Cobo T, Cobo JL, Vega JA. Mechanosensory neurons, cutaneous mechanoreceptors, and putative mechanoproteins. *Microsc Res Tec*. 2012; 75: 1033-43.
- Delmas P, Coste B. Mechano-gated ion channels in sensory systems. *Cell*. 2013. 155:278-84.
- 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.
- Dickey RM, Louis MR, Cox JA, Mohan K, Lee EI, Nigro MG. Noninvasive Facial Rejuvenation. Part 2: Physician-Directed-Neuromodulators and Fillers. *Semin Plast Surg* 2016; 30:134-42.
- Dijkerman HC, de Haan EH. Somatosensory processes subserving perception and action. *Behav Brain Sci*. 2007; 30:189-201.

- Dingman RO, Grabb WC. Surgical anatomy of the mandibular ramus of the facial nerve based on the dissection of 100 facial halves. *Plast Reconstr Surg* 1962; 29:266-72.
- Diogo R, Abdala V, Lonergan N, Wood BA. From fish to modern humans – comparative anatomy, homologies and evolution of the head and neck musculature. *J Anat*. 2008; 213: 391-424.
- Diogo R, Wood BA, Aziz MA, Burrows A. On the origin, homologies and evolution of primate facial muscles, with a particular focus on hominoids and a suggested unifying nomenclature for the facial muscles of the Mammalia. *J Anat*. 2009; 215: 300-19.
- Ekinci N. A study on the branching pattern of the facial nerve of children. *Kaibogaku Zasshi* 1999; 74:447-50.
- Ernfors P, Lee KF, Kucera J, Jaenisch R. Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell*. 1994; 77:503-12.
- 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.
- Fariñas I, Yoshida CK, Backus C, Parada LF. Lack of neurotrophin-3 results in death of spinal sensory neurons and premature differentiation of their precursors. *Neuron*. 1996; 17:1065-78.
- Ferreita LM, Hochman B, Locali RF, Rosa-Oliverira LMQ. A stratigraphic approach to the superficial musculoaponeurotic system and its anatomic correlation with the superficial fascia. *Aesth Plast Surg*. 2006; 30: 549-52.
- Ferreira LM, Locali RF, Lapin GA, Hochman B. Importance to include the term superficial musculoaponeurotic system in medical subject headings and in the international anatomical nomenclature. *Acta Cir Bras*. 2011; 26:242-6.
- Finzi E, Rosenthal NE. Emotional proprioception: Treatment of depression with afferent facial feedback. *J Psychiatr Res*. 2016; 80:93-6.

- Fleming MS, Luo W. The anatomy, function, and development of mammalian A β low-threshold mechanoreceptors. *Front Biol.* 2013; 8. doi: 10.1007/s11515-013-1271-1
- Frayne E, Coulson S, Adams R, Croxson G, Waddington G 2016. Proprioceptive ability at the lips and jaw measured using the same psychophysical discrimination task. *Exp. Brain Res.* 2016; 234: 1679-87.
- Freilinge, G, Happak W, Burggasser G, Gruber H. Histochemical mapping and fiber size analysis of mimic muscles. *Plast Reconstr Surg.* 1990; 86: 422-8.
- Furnas DW. Landmarks for the trunk and the temporofacial division of the facial nerve. *Br J Surg* 1965; 52: 694-6.
- Furnas D. The retaining ligaments of the cheek. *Plast Reconstr Surg* 1989;83:11-6.
- Gardetto A, Daberning J, Rainer C, Piegger J, Piza-Katzer H, Fritsch H. Does a superficial musculoaponeurotic system exist in the face and neck? An anatomical study by the tissue plastination technique. *Plast Reconstr Surg* 2003; 111: 664-72.
- Gassner HG, Rafii A, Young A, Murakami C, Moe KS, Larrabee WE. Surgical anatomy of the face. *Arch Facial Plast Surg.* 2008; 10: 9-19.
- Gataa IS, Faris BJ. Patterns and surgical significance of facial nerve branching within the parotid gland in 43 cases. *Oral Maxillofac Surg* 2016; 20:161-5.
- Ghassemi A, Prescher A, Riediger D, Axer A. Anatomy of the SMAS revisited. *Aesthetic Plast Surg.* 2003; 27: 258-64.
- Gillespie PG, Walker RG. Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature.* 2001; 413:194-202.
- Gong S, Zhou Q, LeDoux MS. Blink-related sensorimotor anatomy in the rat. *Anat Embryol (Berl).* 2003; 207: 193-208.
- Goodmurphy CW, Ovalle WK. Morphological study of two human facial muscles: orbicularis oculi and corrugator supercilii. *Clin Anat.* 1999; 12:1-11.
- Gosain AK. Surgical anatomy of the facial nerve. *Clin Plast Surg* 1995;222:241-6.

- Gosain AK, Yousif NJ, Madiedo G, Larson DL, Matloub HS, Sanger JR. Surgical anatomy of the SMAS: a reinvestigation. *Plast Reconstr Surg* 1993; 92: 1254-63.
- Gu Y, Gu C. Physiological and pathological functions of mechanosensitive ion channels. *Mol Neurobiol*. 2014 ;50:339-347.
- Happak, W., Burggasser, G., Gruber, H. Histochemical characteristics of human mimic muscles. *J. Neurol. Sci.* 83, 25–35.
- Har-Shai Y, Bodner SR, Egozy-Golan D, Lindenbaum ES, Ben-Izhak O, Mitz V, Hirshowitz B. Viscoelastic properties of the superficial musculoaponeurotic system (SMAS): a microscopic and mechanical study. *Aesthetic Plast Surg*. 1997; 21: 219-24.
- Hassouneh B, Brenner MJ. Systematic Review and Meta-Analysis in Facial Plastic Surgery. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2015; 23:273-83.
- Honoré E, Martins JR, Penton D, Patel A, Demolombe S. 2015. The Piezo Mechanosensitive Ion Channels: May the Force Be with You! *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2015 Sep 16.
- Hontanilla B, Marre D. Retrospective study of the functional recovery of men compared with that of women with long-term facial paralysis. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2013; 51: 684-8.
- Horta-Júnior JA, Tamega OJ, Cruz-Rizzolo RJ. Cytoarchitecture and musculotopic organization of the facial motor nucleus in *Cebus apella* monkey. *J Anat*. 2004; 204(Pt 3):175-90.
- Hu KS, Kwak J, Koh KS, Abe S, Fontaine C, Kim HJ. Topographic distribution area of the infraorbital nerve. *Surg Radiol Anat*. 2007; 29:383-8.
- Huggins RJ, Freeman ME, Kerr JB, Mendelson BC. Histologic and ultrastructural evaluation of sutures used for surgical fixation of the SMAS. *Aesthetic Plast Surg*. 2007; 31: 719-24.

- Hur MS, Hu KS, Park JT, Youn KH, Kim HJ. New anatomical insight of the levator labii superioris alaeque nasi and the transverse part of the nasalis. *Surg. Radiol. Anat.* 2010; 32: 753-6.
- Hur MS, Hu KS, Youn KH, Song WC, Abe S, Kim HJ. New anatomical profile of the nasal musculature: dilator naris vestibularis, dilator naris anterior, and alar part of the nasalis. *Clin. Anat.* 2011; 24: 162-7.
- Hwang K. Surgical anatomy of the facial nerve relating to facial rejuvenation surgery. *J Craniofac Surg.* 2014; 25: 1476-81.
- Hwang K, Han JY, Battuvshin D, Kim DJ, Chung IH. Communication of infraorbital nerve and facial nerve: Anatomic and histologic study. *J Craniofac Surg.* 2004; 15:88-91.
- Hwang K, Hwang JH, Cho HJ, Kim DJ, Chung IH. Horizontal branch of the supraorbital nerve and temporal branch of the facial nerve. *J Craniofac Surg.* 2005; 16:647-649.
- Hwang K, Jin S, Park JH, Kim DJ, Chung IH. Relation of mental nerve with mandibular branch of the facial nerve. *J Craniofac Surg* 2007a. 18:165-168.
- Hwang K, Jin S, Park JH, Chung IH. Cutaneous distribution of zygomaticofacial nerve. *J Craniofac Surg.* 2007b; 18:575-577.
- Hwang K, Kim DJ. Attachment of the deep temporal fascia to the zygomatic arch: an anatomic study. *J Craniofac Surg* 1999; 10:342-5.
- 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.
- Inoue KI, Ozaki S, Shiga T, Ito K, Masuda T. Runx3 controls the axonal projection of proprioceptive dorsal root ganglion neurons. *Nat Neurosci.* 2002; 5:946-54.
- Ito J, Moriyama H, Shimada K. Morphological evaluation of the human facial muscles. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 2006; 83: 7-14.

Jia Z, Lu H, Yang X, Jin X, Wu R, Zhao J, Chen L, Qi Z. Adverse Events of Botulinum Toxin Type A in Facial Rejuvenation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Aesthetic Plast Surg.* 2016; doi: 10.1007/s00266-016-0682-1

Johnson KO. The roles and functions of cutaneous mechanoreceptors. *Curr Opin Neurobiol.* 2001; 11:455-61.

Joo W, Yoshioka F, Funaki T, Mizokami K, Rhoton AL Jr. Microsurgical anatomy of the trigeminal nerve. *Clin Anat.* 2014; 27:61-88.

Jost G, Levet Y. Parotid fascia and face lifting: a critical evaluation of the SMAS concept. *Plast Reconstr Surg.* 1984; 74: 42-51.

Jowett N, Mlynarek AM. Reconstruction of cheek defects: a review of current techniques. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010; 18:244-54.

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.

Kahn HA, Bagheri S. Superficial anatomy of the superficial musculo-aponeurotic system (SMAS). *Atlas Oral Maxillofacial Surg Clin N Am.* 2014; 22: 9-16.

Kang YS, Bae YC, Hwang SM, Nam SB. 2005. A simple and quantitative method for three-dimensional measurement of normal smiles. *Ann Plast Surg.* 2005; 54: 379-83.

Klein R, Silos-Santiago I, Smeyne RJ, Lira SA, Brambilla R, Bryant S, Zhang L, Snider WD, Barbacid M. Disruption of the neurotrophin-3 receptor gene *trkC* eliminates Ia muscle afferents and results in abnormal movements. *Nature.* 1994; 368:249-51.

Knize DM. Muscles that act on glabellar skin: a closer look. *Plast Reconstr Surg.* 2000; 105: 350-61.

Krayenbuhl N, Isolan GR, Hafez A, Yasargil MG. The relationship of the fronto-temporal branches of the facial nerve to the fascias of the temporal region: a

- literature review applied to practical anatomic dissection. *Neurosurg Rev* 2007; 30:8-15.
- Kucera J, Ernfors P, Walro J, Jaenisch R. Reduction in the number of spinal motor neurons in neurotrophin 3-deficient mice. *Neuroscience* 1995; 69: 321-30.
- 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.
- 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 N.E. 2007. Neurobiology of orofacial proprioception. *Brain Res Rev.* 2005; 56: 362-83.
- Levanon D, Bettoun D, Harris-Cerruti C, Woolf E, Negreanu V, Eilam R, Bernstein Y, Goldenberg D, Xiao C, Fliegau M, Kremer E, Otto F, Brenner O, Lev-Tov A, Groner Y The *Runx3* transcription factor regulates development and survival of *TrkC* dorsal root ganglia neurons. *EMBO J.* 2002; 21:3454-63.
- Lewin GR, Barde YA. Physiology of neurotrophins. *Annu Rev Neurosci.* 1996 ; 19: 289-317.
- Li C, Jiang XZ, Zhao YF. Connection of trigeminal nerve and facial nerve branches and its clinical significance. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* 2009;18: 545-50.
- Liebl DJ, Tessarollo L, Palko ME, Parada LF. Absence of sensory neurons before target innervation in brain-derived neurotrophic factor-, neurotrophin 3-, and *TrkC*-deficient embryonic mice. *J Neurosci.* 1997;17:9113-21.
- Lumpkin EA, Caterina MJ. Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature.* 2007; 445:858-65.

- Lumpkin EA, Marshall KL, Nelson AM. The cell biology of touch. *J Cell Biol.* 2010; 191:237248.
- Loukas M, Diamond M, Tubbs RS, Wartmann C, Shoja M, Coge-Gadon AA. Peripheral facial nerve communications: surgical and clinical implications. *Clin Anat.* 2011; 24: 8-10.
- Lovell M, Sutton D, Lindeman RC. 1977. Muscle spindles in nonhuman primate extrinsic auricular muscles. *Anat Rec.* 1977; 189: 519-23.
- Lowe JB, Cohen M, Hunter J, Mackinnon SE. Analysis of the nerve branches to the orbicularis oculi muscle of the lower eyelid in fresh cadavers. *Plast Reconstr Surg* 2005;116:1743-9.
- Macchi V, Tiengo C, Porzionato A, Stecco C, Galli S, Vigato E, Azzena B, Parenti A, De Caro R. Anatomico-radiological study of the superficial musculo-aponeurotic system of the face. *Ital J Anat Embryol.* 2007; 112:247-53.
- Macchi V, Tiengo C, Porzionato A, Parenti A, Stecco C, Bassetto F, Scapinelli R, Tagliavento D, De Caro R. Musculocutaneous nerve: histotopographic study and clinical implications. *Clin Anat.* 2007; 20: 400-6.
- Macchi V, Tiengo C, Porzionato A, Stecco C, Vigato E, Parenti A, Azzena B, Weiglein A, Mazzoleni F, De Caro R. Histotopographic study of the fibroadipose connective cheek system. *Cells Tissues Organs.* 2010; 191:47-56.
- Macefield VG. Physiological characteristics of low-threshold mechanoreceptors in joints, muscle and skin in human subjects. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32:135-44.
- Marur T, Tuna Y, Demirci S. Facial anatomy. *Clin Dermatol.* 2014; 32:14-23.
- 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 M. Anatomy for the clinician. *The Facial Nerve*, 2nd Ed. In: May M, Schaitkin BM, editors. New York: Thieme Medical Publishers, 2000.

- McCord S, Codner M, Nahai F, Hester R. Letter: analysis of the nerve branches to the orbicularis oculi muscle of the lower eyelid in fresh cadavers. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 118:556-7.
- McKinney P, Gottlieb J. The relationship of the great auricular nerve to the superficial musculoaponeurotic system. *Ann Plast Surg.* 1985; 14: 310-14.
- McLoon LK, Wirtschafter JD. Regional differences in the orbicularis oculi muscle: conservation between species. *J Neurol Sci.* 1991; 104: 197-202.
- Meaie JD, Agrawal N, Chang D, Lee EI, Nigro MG. Noninvasive Facial Rejuvenation. Part 3: Physician-Directed-Lasers, Chemical Peels, and Other Noninvasive Modalities. *Semin Plast Surg* 2016; 30:143-50.
- Mendelson BC. Surgery of the superficial musculoaponeurotic system: principles of release, vectors, and fixation. *Plast Reconstr Surg.* 2001; 107: 1545-52.
- Mendelson BC, Jacobson SR, Surgical Anatomy of the Midcheek: Facial Layers, Spaces, and the Midcheek Segments. *Clin Plast Surg.* 2008; 35:395-404.
- Mendelson BC, Muzaffar AR, Adams WPJr. Surgical anatomy of the midcheek and malar mounds. *Plast Reconstr Surg.* 2002; 110: 885-96.
- 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.
- Mitz V, Peyronie M. The superficial musculoaponeurotic system (SMAS) in the parotid and cheek area. *Plast Reconstr Surg.* 1976; 58: 80-8.
- Monhouase S. *Cranial nerves. Functional Anatomy*, Cambridge University Press, Cambridge, 2005.
- Montaño JA, Calavia MG, García-Suárez O, Suarez-Quintanilla JA, Gálvez A, Pérez-Piñera P, Cobo J, Vega JA. The expression of ENa(+)-C and ASIC2 proteins in Pacinian corpuscles is differently regulated by TrkB and its ligands BDNF and NT-4. *Neurosci Lett.* 2009; 463:114-8.
- Moore KL, Dalley AF. *Clinically Oriented Anatomy*. 4th Ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. p 859–861, 1999.

Morrison KM, Miesegaes GR, Lumpkin EA, Maricich SM. Mammalian merkel cells are descended from the epidermal lineage. *Dev Biol.* 2009; 336:76-83.

Munger BL, Ide C. The structure and function of cutaneous sensory receptors. *Arch Histol Cytol.* 1988; 51:1-34.

Muzaffar AR, Mendelson BC, Adams Jr WP. Surgical anatomy of the ligamentous attachments of the lower lid and lateral canthus. *Plast Reconstr Surg.* 2002; 110: 873-84 (discussion 897-911).

Nakatani M, Maksimovic S, Baba Y, Lumpkin EA. Mechanotransduction in epidermal Merkel cells. *Pflugers Arch.* 2015; 467:101-8.

Namking M, Boonruangsri P, Woraputtaporn W, G€uldner FH. Communication between the facial and auriculotemporal nerves. *J Anat.* 1994; 185:421-6.

Nelson CC, Blaivas M. Orbicularis oculi muscle in children. Histologic and histochemical characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991; 32:646-54.

Nelson DW, Gingrass RP. Anatomy of the mandibular branches of the facial nerve. *Plast Reconstr Surg.* 1979; 64:479-82.

Nolano M, Provitera V, Caporaso G, Stancanelli A, Leandri M, Biasiotta A, Cruccu G, Santoro L, Truini A. Cutaneous innervation of the human face as assessed by skin biopsy. *J Anat.* 2013; 222:161-9.

Nowinski WL, Chua BC, Johnson A, Qian G, Poh LE, Yi SH, Bivi A, Nowinska NG. Three-dimensional interactive and stereotactic atlas of head muscles and glands correlated with cranial nerves and surface and sectional neuroanatomy. *J Neurosci Methods.* 2013 Feb 14. pii: S0165-0270(13)00071-X.

Oakley RA, Lefcort FB, Clary DO, Reichardt LF, Pevette 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.

Odobescu A, Williams HB, Gilardino MS. Description of a communication between the facial and zygomaticotemporal nerves. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2012; 65:1188-92.

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.

Owsley JQ Jr. SMAS-platysma facelift. A bidirectional cervico-facial rhytidectomy. *Clin Plast Surg* . 1983; 10: 429-40.

Owsley JQ, Agarwal CA. Safely navigating around the facial nerve in three dimensions. *Clin Plast Surg*. 2008; 35: 469-77.

Paluch EK, Nelson CM, Biais N, Fabry B, Moeller J, Pruitt BL, Wollnik C, Kudryasheva G, Rehfeldt F, Federle W. Mechanotransduction: use the force(s). *BMC Biol*. 2015; 13:47.

Pawson L, Slepecky NB, Bolanowski SJ. Immunocytochemical identification of proteins within the Pacinian corpuscle. *Somatosens Mot Res* 2000; 17:159-70.

Pensler JM, Ward JW, Parry SW. The superficial musculoaponeurotic system in the upper lip: an anatomical study in cadavers. *Plast Reconstr Surg*. 1985; 75: 488-94.

Pessa JE. SMAS fusion zones determine the subfacial and subcutaneous anatomy of the human face: fascial spaces, fat compartments, and models of facial aging. *Aesthet Surg J*. 2016; 36:515-26.

Pessa JE, Zadoo VP, Adrian Jr. EK, Yuan CH, Aydelotte J, Garza JR. Variability of the midfacial muscles: analysis of 50 hemifacial cadaver dissections. *Plast Reconstr Surg*. 1998; 102: 1888-93.

Pette D, Staron RS. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol*. 2001; 115: 359-72.

Pitanguy I, Ramos AS. The frontal branch of the facial nerve: the importance of its variations in face lifting. *Plast Reconstr Surg*. 1966; 38:352-6.

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.

- Ramanadham SR, Rohrich RJ. Newer Understanding of Specific Anatomic Targets in the Aging Face as Applied to Injectables: Superficial and Deep Facial Fat Compartments--An Evolving Target for Site-Specific Facial Augmentation. *Plast Reconstr Surg*. 2015; 136(5 Suppl):49S-55S
- 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 GR3, Patapoutian A. Piezo2 is the major transducer of mechanical forces for touch sensation in mice. *Nature*. 2014; 516:121-5.
- Ranade SS, Syeda R, Patapoutian A. Mechanically Activated Ion Channels. *Neuron*. 2015; 87:1162-79.
- Rees TD, Aston SJ. A clinical evaluation of the results of submuscular-aponeurotic dissection and fixation in face lifts. *Plast Reconstr Surg*. 1977; 60: 851-59.
- Reichardt LF, Fariñas I. Neurotrophic factors and their receptors. Roles in neuronal development. En: *Molecular and cellular approaches to neural development*. Cowan WM, Jessell TM, Zipursky SL (Eds.) Oxford University Press, New York, pp. 220-263, 1997.
- Roche NA, Blondeel PN, Van Lierde KM, Vermeersch HF. Facial transplantation: history and update. *Acta Chir Belg* 2015; 115:99-103.
- Rossell-Perry P, Paredes-Leandro P. Anatomic study of the retaining ligaments of the face and applications for facial rejuvenation. *Aesthetic Plast Surg*. 2013; 37:504-12.
- Roudaut Y, Lonigro A, Coste B, Hao J, Delmas P, Crest M. Touch sense: functional organization and molecular determinants of mechanosensitive receptors. *Channels*. 2012; 6:234-45.
- Russo JE, Genden EM. Facial Transplantation. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2016; 24: 367-77.

- 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 mylohyoideus muscles. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 294263.
- Schötz S, Frid J, Löfqvist A 2013. Development of speech motor control: lip movement variability. *J Acoust Soc Am.* 2013; 133: 4210-7.
- Scott W, Stevens J, Binder-Macleod SA. Human skeletal muscle fiber type classifications. *Phys Ther.* 2001; 81: 1810-6.
- Sharif-Naeini R. Contribution of mechanosensitive ion channels to somatosensation. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015; 131:53-71.
- Shim KS, Hu KS, Kwak HH, Youn KH, Koh KS, Fontaine C, Kim HJ. An anatomical study of the insertion of the zygomaticus major muscle in humans focused on the muscle arrangement at the corner of the mouth. *Plast Reconstr Surg.* 2008; 121: 466-73 (discussion 474).
- Shimada K, Moriyama H, Ikeda M, Tomita H, Shigihara S, Gasser RF. Peripheral communication of the facial nerve at the angle of the mouth. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1994; S:110-2.
- 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* 2014; 27:118-30.
- Siemionow M, Gharb BB, Rampazzo A. The face as a sensory organ. *Plast Reconstr Surg.* 2011; 127: 652-62.
- 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.

- Stål P, Eriksson PO, Schiaffino S, Butler-Browne GS, Thornell LE. Differences in myosin composition between human oro-facial, masticatory and limb muscles: enzyme-, immunohisto- and biochemical studies. *J Muscle Res Cell Motil.* 1994; 15: 517-34.
- Stranding S. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*, 40th ed. Elsevier Churchill Livingstone, Amsterdam. 2008.
- Stuzin JM, Backer TJ, Gordon HL. The relationship of the superficial and deep facial fascias: relevance to rhytidectomy and aging. *Plast Reconstr Surg.* 1992; 89: 441-49.
- Tansatit T, Phanchart P, Chinnawong D, Apinuntrum P, Phetudom T, Sahraoui YM. A cadaveric study of the communication patterns between the buccal trunks of the facial nerve and the infraorbital nerve in the midface. *J Craniofac Surg.* 2016; 27:214-8.
- Tsunozaiki M, Bautista DM. Mammalian somatosensory mechanotransduction. *Curr Opin Neurobiol.* 2009; 19:362-9.
- Taylor MD, Holdeman AS, Weltmer SG, Ryals JM, Wright DE. Modulation of muscle spindle innervation by neurotrophin-3 following nerve injury. *Exp Neurol.* 2005; 191:211-22.
- Tessarollo L, Vogel KS, Palko ME, Reid SW, Parada LF. Targeted mutation in the neurotrophin-3 gene results in loss of muscle sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91:11844-48.
- Thaller SR, Kim S, Patterson H, Wildman M, Daniller A. The submuscular aponeurotic system (SMAS): a histologic and comparative anatomy evaluation. *Plast Reconstr Surg.* 1990; 86: 690-6.
- Tohma A, Mine K, Tamatsu Y, Shimada, K. Communication between the buccal nerve (V) and facial nerve (VII) in the human face. *Ann Anat* 2004; 186:173-8.
- Tubbs RS, Mortazavi MM, Shoja MM, Loukas M, Cohen-Gadol AA. The zygomaticotemporal nerve and its relevance to neurosurgery. *World Neurosurg.* 2012; 78:515-8.

- van der Bilt A. Assessment of mastication with implications for oral rehabilitation: a review. *J Oral Rehabil.* 2011; 38, 754-80.
- Vacher C, Cyna-Gorse F. Motor nerves of the face. Surgical and radiologic anatomy of facial paralysis and their surgical repair. *Ann Chir Plast Esthet.* 2015; 60:363-9.
- Vega JA, García-Suárez O, Montañó JA, Pardo B, Cobo JM. The Meissner and Pacinian sensory corpuscles revisited new data from the last decade. *Microsc Res Tech.* 2009; 72:299-309.
- Vega JA, Haro JJ, Del Valle ME. Immunohistochemistry of human cutaneous Meissner and pacinian corpuscles. *Microsc Res Tech.* 1996; 34:351-361.
- Veillon F, Ramos-Taboada L, Abu-Eid M, Charpiot A, Riehm S. Imaging of the facial nerve. *Eur J Radiol.* 2010; 74: 341-8.
- Wild B, Erb M, Eyb M, Bartels M, Grodd W. Why are smiles contagious? An fMRI study of the interaction between perception of facial affect and facial movements. *Psychiatry Res.* 2003; 123: 17-36.
- Wildan T, Nasser N. Aberrant temporal branch of facial nerve. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2016 Apr 7. pii: S0266-4356(16)00134-0.
- Wilson-Pawels L, Stewart T, Akesson EJ, Spacey SD. *Cranial nerves. Function and dysfunction.* 3er Edition. People's Medical Publishing House-USA, 2013.
- Woo SH, Lumpkin EA, Patapoutian A. Merkel cells and neurons keep in touch. *Trends Cell Biol.* 2015; 25: 74-81.
- Wright DE, Zhou L, Kucera J, Snider WD. Introduction of a neurotrophin-3 transgene into muscle selectively rescues proprioceptive neurons in mice lacking endogenous neurotrophin-3. *Neuron* 1997; 19:503-17.
- 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.
- Youn KH, Park JT, Park DS, Koh KS, Kim HJ, Paik DJ. Morphology of the zygomaticus minor and its relationship with the orbicularis oculi muscle. *J Craniofac Surg.* 2012; 23: 546-8.
- Zani R, Fadul R, Dias Da Rocha MA, Santos RA, Alves MC, Ferreira LM Facial nerve in rhytidoplasty: anatomic study of its trajectory in the overlying skin and the most common sites of injury. *Ann Plast Surg* 2003; 51:236-42.
- Zelena J. *Nerves and mechanoreceptors*. Chapman & Hall. London; 1994.
- Zimmerman A, Bai L, Ginty DD. The gentle touch receptors of mammalian skin. *Science.* 2014; 346:950-4.
- Zimny ML. Mechanoreceptors in articular tissues. *Am J Anat.* 1988; 82: 16-32.