



Universidad de Oviedo

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

PROGRAMA DE DOCTORADO
CIENCIAS DE LA SALUD

Órganos de los sentidos y Sistema Nervioso Periférico

Tesis Doctoral

**Anatomía de la sonrisa -
Un estudio sobre los labios**

José Martín Cruces
Oviedo 2023

UNIVERSIDAD DE OVIEDO
PROGRAMA DE DOCTORADO
CIENCIAS DE LA SALUD
Órganos de los sentidos y Sistema Nervioso Periférico

Tesis Doctoral

Anatomía de la sonrisa-
Un estudio sobre los labios

José Martín Cruces

Directores

José A. Vega Álvarez
Juan Luis Cobo Díaz

Oviedo 2023



Universidad de Oviedo

RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis Doctoral	
Español: ANATOMIA DE LA SONRISA – UN ESTUDIO SOBRE LOS LABIOS	Inglés: ANATOMY OF THE SMILE – A STUDY ABOUT LIPS
2.- Autor	
Nombre: José Martín Cruces	
Programa de Doctorado: CIENCIAS DE LA SALUD	
Línea de Investigación: ORGANOS DE LOS SENTIDOS Y SISTEMA NERVIOSO PERIFERICO	
Órgano responsable: CENTRO INTERNACIONAL DE POSTGRADO	

RESUMEN

Introducción y estado actual del problema: La sonrisa es el eje de la estética en odontología. Una parte fundamental de la sonrisa son los labios, que delimitan y enmarcan el resto de la boca. Cada vez son más frecuentes las intervenciones estéticas y cosméticas sobre los labios. Sin embargo, existen pocos estudios que analicen su inervación en humanos. Además de la inervación somatosensorial, los labios tienen inervación propioceptiva. Para desarrollar la mayoría de las funciones que les son propias, los músculos situados en su espesor necesitan tener tono, que depende de la inervación propioceptiva. Los mecanorreceptores específicos de la propiocepción son los husos neuromusculares pero hasta la fecha no han sido descritos en la musculatura labial, si bien estudios recientes han puesto en entredicho esta concepción. En cuanto a la inervación somatosensorial, con independencia del órgano, se establece en base a estudios funcionales y a los morfotipos de formaciones nerviosas sensitivas que contiene. Se acepta comúnmente que los labios, especialmente el bermellón, están muy inervados y detectan, sobre todo, sensaciones táctiles y térmicas. Sin embargo, no hay estudios recientes sobre este tema en humanos, aunque la inervación somatosensorial microscópica ha sido descrita ampliamente en mamíferos. En cuanto a la inervación propioceptiva labial los estudios son casi inexistentes. Por otro lado, teniendo en cuenta que el ácido hialurónico es la molécula más utilizada en estética labial se ha analizado la distribución del receptor CD44 en las células labiales y sus posibles efectos perniciosos.

Hipótesis y Objetivos:

Hipótesis: Los labios humanos, para cumplir con las funciones que normalmente realizan, deben de poseer un aparato nervioso intrínseco aferente (somatosensorial y propioceptivo) bien desarrollado y presentar formaciones nerviosas sensitivas diferenciadas.

El **objetivo general** del estudio es contribuir al conocimiento de la neuroanatomía de los labios humanos en el contexto de la estética de la sonrisa.

Los **objetivos específicos** son los siguientes:

1. Estudiar la inervación somatosensorial de la piel, bermellón y mucosa de los labios, identificando los morfotipos de formaciones nerviosas sensitivas, la localización en relación con la epidermis y la mucosa labiales, además de su perfil inmunohistoquímico.
2. Analizar la distribución en el bermellón, dentro de esas formaciones nerviosas sensitivas de canales iónicos mecanosensibles (PIEZO2, canal iónico sensible al ácido 2 -ASIC2- y potencial de receptor transitorio vanilloide 4 -TRPV4-) y termosensibles (potencial de receptor transitorio melastatina 2 y 8 -TRPM2 y TRPM8- o TRPV1

3. Analizar el aparato nervioso propioceptor de los músculos de los labios para confirmar o denegar la presencia de husos neuromusculares en ellos, e identificar las formaciones nerviosas que los sustituyen.
4. Estudiar la distribución de la inmunorreacción para CD44 en los labios humanos considerándolo como base para una posible actividad biológica del ácido hialurónico en las células que lo expresan.

Material y Técnicas:

Para la realización del presente estudio se utilizaron secciones de tres labios superiores y dos inferiores, de la colección de laboratorio de Grupo de Investigación Acreditado SINPOS de la Universidad de Oviedo. Originalmente, las piezas se fijaron en formol al 10% y se incluyeron de manera rutinaria en parafina, y en el momento del uso se cortaban en secciones seriadas de 10 µm de espesor. Algunos cortes representativos se tiñeron con tricrómico de Masson para determinar los detalles estructurales. Las secciones desparafinadas y rehidratadas se procesaron para inmunohistoquímica indirecta utilizando el kit de detección Leica Bond. Los anticuerpos primarios utilizados fueron para marcar selectivamente axones (proteínas de neurofilamentos: PFN; enolasa neuronal específica: NSE), células de Schwann y las células de la glía terminal (proteína S100: S100P), células del endoneuro (CD34), células del perineuro (Glut1), receptor para el ácido hialurónico), cadena pesas de miosina (MHC), mecanoproteínas (PIEZO2, ASIC2 y TRPV4) y canales termosensibles (TRPV1, TRPM2 y TRPM8)

Resultados: 1) Piel: En asociación con la papila de los folículos pilosos se encuentran corpúsculos tipo Ruffini y células de Merkel PIEZO2 positivas. **2) Bermellón:** Tiene dos tipos predominantes de formaciones nerviosas. El **primero** se localiza en las papilas dérmicas, de morfología irregular y de eje mayor perpendicular a la superficie; se identificaron como corpúsculos de Meissner. Los corpúsculos de Meissner de los labios son capsulados, no tienen células laminares compactas y la intensidad de inmunorreacción para la S100P es siempre menor que en las células de Schwann de las fibras nerviosas que los suplen. Por otro lado, el patrón de expresión de la NSE no sigue el típico del axón de ese tipo de corpúsculos, sino que es más compacto y tiene un aspecto puntiforme. El **segundo**, correspondiente a los denominados corpúsculos glomerulares, se dispone por debajo del epitelio, no es capsulado, es de aspecto redondeado y compacto, y tanto los marcadores axónicos como los de la glía terminal adoptan aspecto puntiforme y glomerular. Los axones de los corpúsculos de Meissner y glomerulares expresan inmunorreacción para ASIC2 y PIEZO2. **3) Mucosa labial:** contiene escasas formaciones nerviosas sensitivas de difícil filiación morfológica. En cuanto a la inervación propioceptiva, no se observaron propioceptores típicos, pero si abundantes formaciones nerviosas sensitivas similares a los corpúsculos Ruffini y Pacini, cuyos axones son positivos para la mecanoproteína PIEZO2.

Conclusiones:

Tras un análisis detallado de los resultados y de la oportuna discusión de estos, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. Los folículos pilosos de la piel hirsuta de los labios tienen asociados corpúsculos de tipo Ruffini-like y paciniformes. Las células de Merkel en relación con las papilas expresan inmunorreacción para la mecanoproteína PIEZO2.
2. En el bermellón se han localizado dos morfotipos de corpúsculos sensitivos: corpúsculos de Meissner y glomerulares, con diferentes patrones de densidad y localización en los labios superior e inferior.
3. Los corpúsculos de Meissner son capsulados, tienen una citoarquitectura y patrón de inmunomarcaje distintos de los de la piel glabra. Sus axones presentan inmunorreacción para ASIC2 y PIEZO2.
4. Los corpúsculos glomerulares son acapsulados, y tienen una citoarquitectura semejante a la de otras localizaciones anatómicas, especialmente genitales. Sus axones presentan inmunorreacción para ASIC2 y PIEZO2.
5. La inervación propioceptiva de los labios humanos, especialmente el músculo *orbicularis oris*, está representada por distintos morfotipos de corpúsculos sensitivos Ruffini-like y Pacini-like, con axones PIEZO2 positivos, y por la ausencia de husos neuromusculares.
6. El receptor para el ácido hialurónico CD44 se expresa de manera ubicua en todos los tejidos labiales diferenciados pero no en los telocitos CD34 positivos. Ello sugiere que a nivel de los labios el ácido hialurónico no tienen efectos proliferativos ni de diferenciación celular

SUMMARY

Introduction and state of the art: The smile is the axis of aesthetics in dentistry. A fundamental part of the smile are the lips, which delimit and frame the rest of the mouth. Aesthetic and cosmetic interventions of the lips are becoming more frequent, even so there are very few anatomical studies and fewer that study the sensitive part of lips. In addition to somatosensory innervation, the lips have proprioceptive innervation. To develop most of the functions inherent to the lips, the muscles located inside need to have tone, which is related to proprioceptive innervation. The specific mechanoreceptors of proprioception are the neuromuscular spindles but they have not been described yet in the labial region. The orbicularis muscle of the lips is the main one and is the one which the thesis is focused, currently its classic description is questioned. As for somatosensory innervation, regardless of the organ, it is established based on functional studies and the types of sensory nerve formations it contains. It is commonly accepted that the lips, especially vermilion, has a great innervation, and very discriminatory, especially tactile and thermal. However, there are no recent studies on this topic in humans. Microscopic somatosensory innervation has been widely described in animals, but in humans' studies are very limited as is proprioceptive innervation. On the other hand, considering that hyaluronic acid is the most used molecule in lip aesthetics, the distribution of its CD44 receptor in them has been analyzed.

Hypotheses and Objectives:

Hypothesis: Human lips to fulfill the functions they normally perform must have a well-developed afferent intrinsic nervous apparatus (somatosensory and proprioceptive) and present differentiated sensory nerve formations.

The **general objective** of the study is to contribute to the knowledge of the anatomy of human lips in the context of smile aesthetics.

The **specific objectives** are as follows:

1. To study the somatosensory innervation of the skin, vermilion and mucosa of the lips identifying the morphotypes of sensory nerve formations, the location in relation to the epidermis and labial mucosa, in addition to their immunohistochemical profile.
2. Analyze the distribution in the vermilion, within these sensory nerve formations of mechanosensitive ion channels (PIEZO2, acid-sensitive ion channel 2 -ASIC2- and vanilloid transient receptor potential 4 -TRPV4-) and thermosensitive (transient receptor potential melastatin 2 and 8 -TRPM2 and TRPM8- or TRPV1
3. Analyze the proprioceptor nervous system of the muscles of the lips to confirm or deny the presence of neuromuscular spindles in them and identify the nerve formations that replace them.
4. To study the distribution of the immunoreaction for CD44 in human lips considering it as a basis for a possible biological activity of hyaluronic acid in the cells that express it.

Materials and Techniques: To carry out the present study, sections of three upper and lower lips from the laboratory collection of the SINPOS Accredited Research Group of the University of Oviedo were used. Originally, the parts were fixed in 10% formaldehyde and routinely included in paraffin, and at the time of use were cut into serial sections 10 µm thick. Some representative cuts were stained with Masson trichrome to determine structural details. Dewaxed and rehydrated sections were processed for indirect immunohistochemistry using the Leica Bond detection kit. The primary antibodies used were to selectively label axons (neurofilament proteins: NFP; neuronal enolase specific: NSE), Schwann cells and terminal glial cells (S100 protein: S100P), endoneurium cells (CD34), perineurium cells (Glut1), receptor for hyaluronic acid), myosin weight chain (MHC), mechanoproteins (PIEZO2, ASIC2 and TRPV4) and thermosensitive channels (TRPV1, TRPM2 and TRPM8)

Results: 1) **Skin:** In association with the papilla of hair follicles are Ruffini corpuscles and Merkel cells PIEZO2 positive. 2) **Vermillion:** It has two predominant types of nerve formations. The first morphotype is in the dermal papillae, of irregular morphology and major axis perpendicular to the surface; they were identified as Meissner corpuscles. The Meissner corpuscles of the lips are capsulated, do not have compact lamellar cells and the immunoreaction intensity for S100P is always lower than in the Schwann cells of the nerve fibers that supply them. On the other hand, the expression pattern of the NSE does not follow the typical axon of this type of corpuscle but is either more compact or has a pointed appearance. The second, glomerular corpuscles, is arranged below the epithelium, is not capsulated, is rounded and compact, and

both axon markers and glial markers end terminal adopt a pointed and glomerular appearance. Meissner's and glomerular corpuscle axons express immunoreaction for ASIC2 and PIEZO2. 3) **Labial mucosa**: contains few sensory formations of difficult morphological filiation. As for proprioceptive innervation, no typical proprioceptors were observed but they did find abundant sensory nerve formations like Ruffini and Pacini-like, whose axons are positive for the mechanoprotein PIEZO2.

Concluding remarks: After a detailed analysis of the results and the timely discussion of these, we have reached the following conclusions:

1. The hair follicles of the hirsute skin of the lips have associated Ruffini-like and paciniform corpuscles. Merkel cells in relation to papillae express immunoreaction to the mechanoprotein PIEZO2.
2. Two morphotypes of sensory corpuscles have been in the vermilion: Meissner's and glomerular corpuscles, with different patterns of density and location in the upper and lower lips.
3. Meissner's corpuscles are capsulated, have a cytoarchitecture and immunolabelling pattern distinct from those of glabrous skin. Its axons have immunoreaction to ASIC2 and PIEZO2.
4. The glomerular corpuscles are capsulated and have a cytoarchitecture like that of other anatomical locations, especially genital. Its axons have immunoreaction to ASIC2 and PIEZO2.
5. The proprioceptive innervation of human lips, especially the orbicularis oris muscle oris, is represented by different morfotypes of Ruffini-like and Pacini-like sensory corpuscles, with positive PIEZO2 axons, and by the absence of neuromuscular spindles.
6. The receptor for hyaluronic acid CD44 is ubiquitously expressed in all differentiated labial tissues but not in CD34 positive telocytes. This suggests that at the level of the lips hyaluronic acid has no proliferative effects or cell differentiation.

A mi familia, sin olvidarme de mis tíos de Oviedo,
sin vosotros esto no hubiese sido posible.
Y en especial a mis padres, por guiarme en lo profesional,
pero sobre todo en lo personal.

Mis mayores agradecimientos al Área de Anatomía y Embriología Humana del Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Oviedo. Especialmente a Yoli y Patri, porque sin su ayuda desinteresada este trabajo no existiría.

Agradecimientos también a José Antonio, Juanda y todo el resto de la familia de Oviedo.

Me acogisteis entre vosotros y me he sentido uno más durante estos años.

Dedicatoria
Agradecimientos

- 1.- **Introducción**
- 2.- **Estado actual del problema**
- 3.- **Hipótesis y Objetivos**
- 4.- **Material y Técnicas**
- 5.- **Resultados**
- 6.- **Discusión**
- 7.- **Conclusiones**
- 8.- **Bibliografía**

Anexo 1 – Curriculum vitae

Anexo 2 – Artículos derivados de la Tesis Doctoral

1. Introducción

1. Introducción

La estética dentofacial es una aspiración de la sociedad actual, pero no es nueva. En 1978, Matthews publicó un artículo titulado *“The anatomy of smile”* en el que afirmaba: *“La anatomía de la sonrisa es una parte integral de la odontología. Su comprensión implica un análisis minucioso de todos los elementos de la región oral. No es suficiente establecer el tamaño de los dientes en función de las líneas de labios, el tamaño de la boca [...]. Para crear una sonrisa armoniosa, el dentista debe mantener o crear la curvatura normal de los labios, la exposición adecuada de la zona roja de los labios, un filtrum no distorsionado y surcos nasolabiales inalterados. Estas entidades, mantenidas en armonía con la parte de los dientes expuesta, constituyen la anatomía de la sonrisa”*.

Treinta y cinco años más tarde, Andre W. Machado (2014), basándose en los trabajos de Kokich et al. (1999), escribió *“Los 10 mandamientos de estética de la sonrisa”*. Se trata de un protocolo para evaluar la estética de la sonrisa del paciente que tiene como finalidad simplificar la aplicabilidad clínica y la planificación interdisciplinaria del tratamiento de la sonrisa. El último mandamiento está relacionado con la estructura que enmarca la sonrisa: **los labios**. El canon actual de belleza incluye labios voluminosos y mayor exposición incisiva maxilar al sonreír, tanto en reposo como durante la función.

El presente trabajo de Tesis Doctoral se centra en el estudio de algunos aspectos de la anatomía e inervación de los labios; sin un conocimiento adecuado y preciso de esos dos aspectos resulta difícil entender las intervenciones estéticas quirúrgicas sobre ellos (ver Stanley et al., 2017; Biglioli y Allevi, 2023). Además, se analiza la posible acción biológica de uno de los compuestos más utilizados en cosmética labial, el ácido hialurónico (AH).

En el estudio se analiza la inervación somatosensorial (ver Martín-Alguacil et al., 2021) de los labios. La somatosensibilidad de los labios humanos, sobre todo del bermellón, es alta. Sin embargo, los estudios sobre el tema son muy escasos (Seto, 1963; Nolano et al., 2013). Los estudios de microneurografía sugieren que en los labios humanos existen aferentes mecanoreceptivos de bajo umbral (LTMR) (Trulsson y Johansson, 2002; Bukowska et al., 2010; Trulsson y Essick, 2010), que en la piel corresponden a los

complejos de células de Merkel-neurita, los corpúsculos de Ruffini y los corpúsculos de Meissner, respectivamente (Zimmerman et al., 2014; Cobo et al., 2021). Mediante técnicas de inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos contra marcadores axónicos, gliales y proteínas relacionadas con la mecanotransducción, se ha analizado en detalle la innervación de los labios superior e inferior (Cobo et al., 2020).

Además de la innervación somatosensorial, los labios tienen innervación propioceptiva. Para desarrollar la mayoría de las funciones inherentes a los labios, los músculos situados en su espesor, especialmente el *orbicularis oris*, necesitan tener tono, que está relacionado con la innervación propioceptiva. Los mecanorreceptores específicos de la propiocepción son los husos neuromusculares (ver Cobo et al., 2021) y los músculos faciales carecen de estas formaciones sensitivas que son sustituidas por otras estructuras que cumplen esa misma función (Cobo et al., 2017a); la innervación propioceptiva de los músculos cefálicos depende exclusivamente del nervio trigémino (Lazarov, 2007) a través de las uniones que establece con el nervio facial (Cobo et al., 2017b, 2019, 2021). Trabajos previos de nuestro grupo de investigación no han podido demostrar nunca husos neuromusculares en los músculos innervados por el facial. Sin embargo, recientemente May et al. (2018, 2022) han demostrado la existencia de husos neuromusculares en el músculo *platysma coli*, y Omstead et al. (2023) afirman que los músculos faciales de la mayor parte de los vertebrados los contienen. En esta Tesis Doctoral también se investiga, de nuevo, su existencia en el músculo orbicular de los labios humanos.

La tesis se completa con un trabajo sobre la manipulación cosmética no quirúrgica de los labios. Según Chiu et al. (2016) y Bukhari et al. (2018), de todas las intervenciones de medicina estética sobre los labios el 85% utiliza ácido hialurónico (AH). Este compuesto, del cual existen numerosos preparados comerciales, se cree que tiene preferentemente un efecto mecánico de relleno y que, debido a sus propiedades hidrofílicas, actúa aumentando el volumen de los tejidos donde se inyecta. Sin embargo, no se puede descartar que, además, ejerza un efecto biológico. Se sabe que el AH es capaz de unirse a diferentes receptores celulares, especialmente al CD44 (Savani et al., 2001; Weng et al., 2022). Eso equivale a afirmar que si los músculos o en las células de los tabiques de

tejido conectivo localizados entre ellos expresan CD44, el AH puede tener un papel biológico además del mecánico. De ser así, es de gran importancia identificar si los receptores están en las células musculares o en los fibroblastos-fibrociitos de los tabiques, ya que la activación de CD44 produce proliferación, adhesión y/o migración celular, reorganización del citoesqueleto y angiogénesis (Toole 2004; Weng et al., 2022).

En base a lo expuesto en los párrafos anteriores, esta Tesis Doctoral pretende contribuir al conocimiento de la neuronatomía de los labios humanos estudiando su inervación somatosensorial y propioceptiva; además, se analizará el posible papel biológico del AH en los labios.

2. Estado actual del problema

2. Estado actual del problema

2.1. Introducción

Los labios son una parte del rostro humano esencial para la expresión facial, la masticación, el habla y la fonación, el tacto y la sensación térmica, la atracción física y la sexualidad. En la actualidad representan una de las regiones anatómicas sobre las que más se actúa en los tratamientos quirúrgicos y estéticos (DeJoseph et al., 2018; Kar et al., 2018; Holden, 2020; Boson et al., 2021).

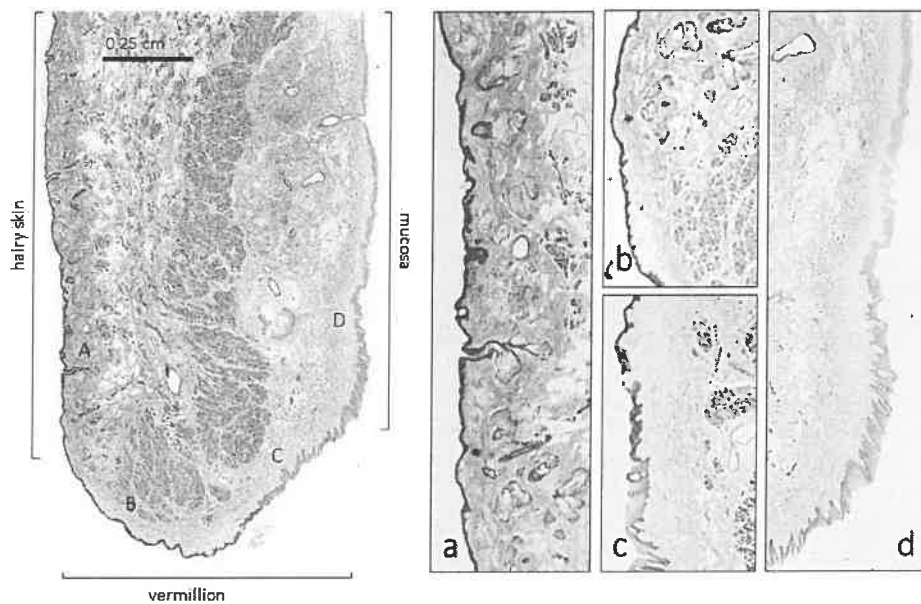


Figura 2.1.1.- Sección transversal del tercio central de un labio superior humano (izquierda). Los detalles corresponden a la piel (a), el segmento externo (b) e interno (c) del bermellón, y la mucosa labial (D).

Estructuralmente son dos pliegues músculo-cutáneo-mucosos que contienen músculos, vasos y nervios (Hur et al., 2010; Shim et al., 2008; Piccinin y Zito, 2022). Su superficie externa es piel con vello, con abundantes glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas; la superficie interna está revestida con una mucosa húmeda; y los bordes están cubiertos con una capa epitelial de transición llamada bermellón (*vermillion* en la literatura en inglés; ver Boukovalas et al., 2017). (Figura 2.1.1)

Los labios reciben inervación somatosensorial a través de ramas del nervio infraorbitario (labio superior; Hwang et al., 2004, 2007) y del nervio mentoniano (labio inferior; Alsaad

et al., 2003; Hu et al., 2006, 2007a,b) del nervio trigémino. Además, el nervio facial por medio de la rama bucal proporciona inervación motora al *orbicularis oris*, músculos elevadores del labio y músculos del ángulo de los labios, mientras que la rama mandibular marginal suministra inervación motora a la mayoría de los músculos responsables de la depresión del labio (Hwang et al., 2006; Cataneo y Pavesi, 2014). La zona labial más ricamente inervada es el bermellón (Rath y Essick, 1990).

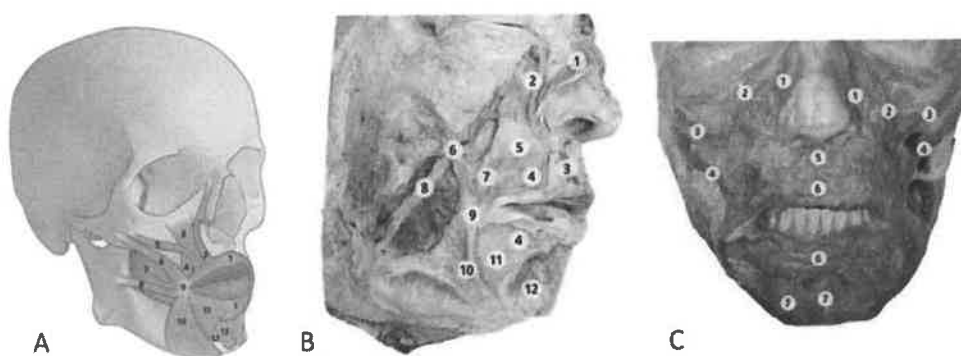


Figura 2.1.2.- Esquema (A), disección en cadaver fijado (B) y disección en cadaver fresco (C) de los músculos de los labios. A. 1: orbicularis oris; 2: lateral levator labii superioris alaeque nasi; 3: levator labii superioris; 4: levator anguli oris; 5 zygomaticus minor; 6: zygomaticus mayor; 7: buccinator; 8: risorius; 10: depressor anguli oris; 11: depressor labii inferioris; 12: incisivus labii inferioris; 13: mentalis. B. 1: nasalis; 2: levator labii superioris alaeque nasi; 3: depressor septi nasi; 4: orbicularis oris; 5: levator labii superioris; 6: zygomaticus mayor; 7: levator anguli oris; 10: depressor anguli oris; 11: depressor labii inferioris; 12: mentalis. C. 1 y 2: levator labii superioris alaeque nasi; 3: zygomaticus minor; 4: zygomaticus mayor; 5: depressor septi nasi; 6: orbicularis oris; 7: mentalis. Apartado de von Arx et al. (2018).

Un apartado de esta Tesis se centra en la inervación propioceptiva de los músculos de los labios, en especial del músculo *orbicularis oris*. Los labios humanos se disponen en dos planos, superficial y profundo, separados entre sí por una capa de tejido conectivo que contiene ramas del nervio facial. Los músculos profundos son el *orbicularis oris* y el músculo *buccinator*; los superficiales son el *mentalis*, *risorius*, *zygomaticus major* y *minor*, *levator labii superioris*, *levator labii superioris alaeque nasi*, *depressor anguli oris* and *depressor labii inferioris* y algunas partes del *orbicularis oris* (Pessa et al., 1998; Shim et al., 2008; Hur et al., 2010; Marur et al., 2014) (Figura 2.1.2). Recientemente han sido puestas en entredicho las descripciones anatómicas clásicas, ya que algunos textos y artículos afirman que no hay fibras musculares del músculo *orbicularis oris* en el labio

superior. Sin embargo, Park et al. (2022) las encontraron con regularidad en todas las disecciones realizadas. Conocer la anatomía de este músculo es crucial para mejorar los procedimientos cosméticos y quirúrgicos realizados sobre el labio superior, así como la corrección de la sonrisa gingival.

2.2. Inervación somatosensorial de los labios

La inervación somatosensorial de cualquier órgano se establece en base a estudios funcionales y a los tipos de formaciones nerviosas sensitivas que contiene. Se acepta comúnmente que los labios, especial el bermellón, tiene una gran inervación, y muy discriminatoria, especialmente táctil y térmica. Sin embargo, no hay estudios recientes sobre este tema en humanos.

La inervación somatosensorial microscópica de los labios ha sido ampliamente investigada en diferentes especies de mamíferos como ratón (Yamamoto et al., 1981), rata (Yamamoto et al., 1986; Tachibana et al., 1987a; Watanabe et al., 2013), gato y cerdo enano (Tachibana et al., 1989), perro (Tachibana et al., 1987a), *Monodelphis domestica* (Schulze et al., 1983), o el mono *Cebus apella* (Iyomasa et al., 1978). En todas estas especies se identificaron diferentes morfotipos de corpúsculos sensitivos en la piel labial, bermellón y mucosa labial (véase también Watanabe, 2004).

Sin embargo, los datos en humanos no son abundantes. La literatura clásica fue actualizada hace 60 años por Seto (1963) quien informó la presencia de "*terminaciones sensoriales ramificadas complejas*", "*cuerpos glomerulares no encapsulados*", "*terminaciones glomerulares encapsuladas (cuerpo nervioso genital tipo I)*" y "*terminaciones sensoriales plexiformes*". Más recientemente, Nolano et al. (2013), en muestras de labios biopsiados, observaron abundantes fibras nerviosas intraepiteliales, complejos piloneurales de fibras no mielinizadas y mielinizadas, además ocasionalmente corpúsculos similares a los de Meissner, complejos de células de Merkel-neurita y corpúsculos similares a los de Ruffini.

Por otro lado, los resultados de los estudios de microneurografía también apoyan la presencia de diferentes categorías de aferentes mecanoreceptivos de bajo umbral (low-threshold mechanoreceptors: LTM) en los labios, incluidos los LTM de adaptación lenta (SA) de tipo I y tipo II, y los LTM de adaptación rápida (AR) de tipo I, pero no los de AR tipo II (Trulsson y Johansson, 2002; Bukowska et al., 2010; Trulsson et al., 2010). Estructuralmente corresponden a complejos célula-neurita de Merkel, corpúsculos de Ruffini y corpúsculos de Meissner, respectivamente (Zimmerman et al., 2014; Cobo et al., 2021).

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha planificado la realización de un estudio que analice la inervación somatosensorial de los labios humanos adultos en base a la morfología de las formaciones nerviosas sensitivas, su perfil inmunohistoquímico (ver Cobo et al., 2021) y la aparición dentro de esas formaciones de canales iónicos involucrados en la mecanodetección (PIEZO2, canal iónico sensible al ácido 2-ASIC2- y potencial de receptor transitorio vanilloide 4 -TRPV4-) y la detección de temperatura (potencial de receptor transitorio melastatina 2 y 8 -TRPM2 y TRPM8- o TRPV1) (ver Martín-Alguacil et al., 2022).

2.3. Inervación propioceptiva de los labios

Aparte de la inervación somatosensorial y motora, los labios tienen inervación propioceptiva responsable del mantenimiento del tono muscular de los músculos que contienen (Neilson et al., 1979). La propiocepción juega un papel clave en la expresión y coordinación facial, la regulación de la fuerza masticatoria y el comportamiento oromotor y la comunicación facial no verbal, así como en los reflejos orofaciales relacionados con el habla, la deglución, la tos, el vómito o la respiración (Wild et al., 2003; Kang et al., 2005; van der Bilt, 2011; Hontanilla y Marre, 2013; Schötz et al., 2013; Cattaneo y Pavesi, 2014; Frayne et al., 2016) .

La inervación propioceptiva de los músculos faciales, incluidos los labiales, no es completamente conocida, pero se acepta que reciben fibras nerviosas propioceptivas del trigémino a través de las conexiones trigémino-facial (Lazarov, 2007; Won et al., 2014;

Cobo et al., 2017b). Sin embargo, los músculos faciales carecen de propioceptores típicos, es decir, husos musculares (Cattaneo y Pavesi, 2014), que son reemplazados por otras formaciones nerviosas sensitivas con propiedades propioceptivas (ver Cobo et al., 2017a; 2019).

Para realizar intervenciones precisas y con éxito sobre los labios, es necesario comprender la anatomía y fisiología de esta región anatómica. Uno de los estudios que se han llevado a cabo en esta Tesis Doctoral fue el de la inervación propioceptiva de los labios humanos adultos. Se basa en la identificación de propioceptores morfológicamente diferenciados y la detección dentro de ellos de PIEZO2, un canal iónico mecanosensible que se considera involucrado en la propiocepción (Woo et al., 2015; Nagel y Chesler, 2022). Esta parte del trabajo tiene como objetivo proporcionar un análisis detallado de la inervación propioceptiva de los labios humanos que pueda servir para todas las especialidades médicas y odontológicas que manipulan los nervios de los labios con fines terapéuticos (especialmente transposiciones nerviosas en el tratamiento de parálisis faciales; Liu et al., 2019).

2.4. El ácido hialurónico en la estética labial humana

Como se expuso en apartados anteriores, los labios son uno de los objetivos más comunes en los tratamientos estéticos faciales (Kar et al., 2018; Holden, 2020). Según la Sociedad Americana de Cirugía Plástica y Estética, más del 85% de todos los rellenos dérmicos no quirúrgicos con fines estéticos se realizan con alguno de los derivados del AH (Chiu et al., 2016; Bukhari et al., 2018). La popularidad de este compuesto se debe a su efectividad, facilidad de administración y perfil de seguridad (Beasley et al., 2009). Las formulaciones inyectables intradérmicas de AH proporcionan una herramienta atractiva para contrarrestar el envejecimiento de la piel (por ejemplo, arrugas faciales, sequedad y pérdida de elasticidad; Bravo et al., 2022) y restaurar las funciones dérmicas normales, a través de procedimientos simples y mínimamente invasivos (Bukhari et al., 2018).

El uso de HA, o hialuronano, en medicina estética se basa principalmente en el efecto mecánico de llenado entre los planos de escisión del sistema músculo-aponeurótico

superficial de la cara (Fagien et al., 2019). Pero además, el AH tiene efectos bioestimulantes a través de la interacción con receptores de membrana como CD44, receptores tipo toll (TLR-4), molécula de adhesión 1 (ICAM-1), integrinas y receptor para la motilidad mediada por HA (RHAMM) (Savani et al., 2001; Jiang y otros, 2007; Vigetti et al. 2014; Avenoso et al., 2018; Weng et al., 2022). En particular, las actividades fisiológicas de los receptores CD44, que se unen principalmente a cadenas largas de HA, participan en la proliferación celular, adhesión y migración, angiogénesis y citoesqueleto (Toole 2004; Weng et al., 2022).

Sin embargo, se desconoce si el efecto del AH en los tratamientos estéticos faciales, incluidos los labios, es puramente mecánico o también biológico, y si es biológico cuáles son las posibles dianas celulares. En la presente investigación se analizó la presencia y distribución de CD44 en los tejidos de los labios humanos prestando especial atención a la presencia de CD44 en los telocitos cutáneos que participan en la homeostasis tisular, morfogénesis, regeneración y reparación (Díaz-Flores et al., 2016, 2021).

3. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

Los labios humanos, para cumplir con las funciones que normalmente realizan, deben de poseer un aparato nervioso intrínseco aferente (somatosensorial y propioceptivo) bien desarrollado y presentar formaciones nerviosas sensitivas diferenciadas.

Objetivos

El **objetivo general** del estudio es contribuir al conocimiento de la neuroanatomía de los labios humanos en el contexto de la estética de la sonrisa.

Los **objetivos específicos** son los siguientes:

1. Estudiar la inervación somatosensorial de la piel, bermellón y mucosa de los labios identificando los morfotipos de formaciones nerviosas sensitivas, su localización en relación con la epidermis y la mucosa labiales, además de su perfil inmunohistoquímico.
2. Analizar la distribución en el bermellón, dentro de las formaciones nerviosas sensitivas de canales iónicos mecanosensibles (PIEZO2, canal iónico sensible al ácido 2 -ASIC2- y potencial de receptor transitorio vanilloide 4 -TRPV4-) y termosensibles (potencial de receptor transitorio melastatina 2 y 8 -TRPM2 y TRPM8- o TRPV1
3. Analizar el aparato nervioso propioceptor de los músculos de los labios, en especial del musculo *orbicularis oris*, para confirmar o denegar la presencia de husos neuromusculares en ellos, y si no los hay identificar las formaciones nerviosas que los sustituyen.
4. Estudiar la distribución de la inmunorreacción para CD44 en los labios humanos considerándolo como base para una posible actividad biológica del ácido hialurónico en las células que lo expresan.

4. Material y Técnicas

4. Material y técnicas

4.1. Material

Para la realización del estudio se utilizaron secciones de tres labios superiores y dos inferiores, de la colección de laboratorio de Grupo de Investigación Acreditado SINPOS (Registro Nacional de Biobancos, Sección colecciones, Ref. C-0001627). La edad de los sujetos era de 60, 66, 72, 75 y 89 años, 3 mujeres y 2 hombres. Los labios se dividieron en tres zonas: medial (entre ambas crestas del *filtrum* en el labio superior y un segmento central de 2 cm en el labio inferior), lateral (2 cm medial a la comisura oral) y medio (entre los dos anteriores). Originalmente, las piezas se fijaron en formol al 10% y se incluyeron de manera rutinaria en parafina, y en el momento del uso se cortaban en secciones seriadas de 10 μm de espesor. Algunos cortes representativos se tiñeron con tricrómico de Masson para determinar los detalles estructurales.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Biomédica del Principado de Asturias, España (Cod. CEIm, PAst: Proyecto 266/18).

4.2. Técnicas

4.2.1. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Las secciones desparafinadas y rehidratadas se procesaron para inmunohistoquímica indirecta utilizando el kit de detección Leica Bond™ (Leica Biosystems™, Newcastle, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los anticuerpos primarios utilizados marcan selectivamente axones (proteínas de neurofilamentos: PFN; enolasa neuronal específica: NSE), células de Schwann y las células de la glía terminal (proteína S100: S100P), células del endoneuro (CD34), células del perineuro (Glut1), receptor para el ácido hialurónico (CD44), cadena pesada de miosina (MHC), mecanoproteínas (PIEZO2, ASIC2 y TRPV4) y canales termosensibles (TRPV1, TRPM2 y TRPM8) (ver **Tabla 4.2.1**). La inmunohistoquímica indirecta incluyó varios controles negativos y positivos, así como controles internos positivos y negativos.

Tabla 4.2.1.- Anticuerpos primarios utilizados en el estudio

Antígeno	Origen	Dilución	Suministrador
CD34 (clone QB-END/10)	Ratón	Prediluido	Master Diagnostica ¹
CD44	Conejo	1:200	BosterBiological ²
Glut1	Conejo	0.5 µg/ml	Cell Marque ³
MHC	Conejo	1 :200	ThermoFisher S ⁴
NSE (clone BBS/NC/VI-H14)	Ratón	1:1000	Dako ⁵
NFP (clone 2F11)	Ratón	1:100	Dako ⁵
PIEZO2	Conejo	1:200	Sigma-Aldrich ⁶
TRPM2	Conejo	1:100	ThermoFisher S ⁴
TRPM8	Conejo	1:200	Sigma-Aldrich ⁶
TRPV1	Conejo	1:200	Sigma-Aldrich ⁶
TRPV4	Conejo	1:200	LifeSpan ⁷
ASIC2	Conejo	1:200	LifeSpan ⁷
S100 protein (clone 4C4.9)	Ratón	1:1000	ThermoFisher S ⁴
S100 protein	Conejo	1:1000	Dako ⁵

¹Granada, Spain; ²Pleasanton, CA, USA; ³Freemont, CA, USA; ⁴Seattle, WA, USA; ⁵Glostrup, Denmark; ⁶Saint Louis, MS, USA; ⁷Seattle, WA, USA.

Además, en secciones desparafinadas y rehidratadas se realizó doble inmunofluorescencia, para detectar simultáneamente S100P y CD34, y CD34 y CD44. Brevemente, se redujo la unión no específica (incubación durante 30 minutos con una solución de albúmina sérica bovina al 5% en solución salina tamponada con Tris (TBS), pH 7,4). Las secciones se incubaron durante la noche a 4 ° C en una cámara húmeda con una mezcla 1: 1 (v / v) de anti-S100P y anti-CD34 o anti-CD34 y CD44. Después del lavado, las secciones se incubaron durante 1 hora con IgG de cabra anti-conejo conjugado con Alexa Flúor 488 (Serotec™, Oxford, Reino Unido, diluido 1:1000), se enjuagaron nuevamente y se incubaron durante 1 hora con un IgG de cabra anti-conejo conjugado con IgG de asno anti-ratón conjugado con Cy3 (Jackson-ImmunoResearch™, Baltimore, MD, EUA, diluido 1:50). Ambos pasos se realizaron a temperatura ambiente de 20° C, en una cámara oscura y húmeda. A continuación, se lavaron y montaron las secciones con Fluoromount Gold (ThermoFisher, Runcoen, Reino Unido), y finalmente se incubaron las secciones con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; 10 ng / ml) para marcar los núcleos. La tinción triple se detectó utilizando un microscopio de fluorescencia automática Leica DMR-XA junto con Leica Confocal Software, versión 2.5 (Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Alemania), y las imágenes capturadas se procesaron utilizando el software ImageJ, versión 1.43 g en

el Master Biophotonics Facility, McMaster University, Ontario, Canadá (www.macbiophotonics.ca). Como controles, se procesaron secciones representativas de la misma manera que se describió anteriormente, utilizando sueros no inmunes de conejo o ratón en lugar de anticuerpos primarios u omitiendo anticuerpos primarios en la incubación.

4.2.2. Análisis cuantitativo

Esta parte del trabajo se llevó a cabo para establecer la densidad de corpúsculos sensitivos en el bermellón. Los labios se dividieron en tres zonas: central (entre ambas crestas de filtrum en el labio superior y un segmento central de 2 cm en el labio inferior), lateral (2 cm mediales a la comisura oral) y medio (1 cm entre las zonas medial y lateral). Se utilizaron diez secciones de cada zona, de 10 μm de espesor, separadas por 200 μm , procesadas para la detección de S100P para identificar corpúsculos sensitivos. Las secciones fueron escaneadas con un escáner SCN400F (Leica Biosystems), y las capturas fueron almacenadas y procesadas utilizando el software SlidePath Gateway LAN (Leica Biosystems™).

Sobre las imágenes capturadas, se seleccionaron al azar 5 campos de 400 μm^2 cada uno y se contaron de manera independiente por dos observadores el número de corpúsculos sensitivos, adscribiéndolos a corpúsculos de Meissner o a corpúsculos glomerulares. Los valores se expresan como la media de los corpúsculos sensitivos por mm^2 . Debido al bajo número de corpúsculos muestreados, no se realizó ningún análisis estadístico.

5. Resultados

5. Resultados

5.1. Inervación somatosensorial de los labios humanos

En este apartado se analizaron los morfotipos de corpúsculos presentes en los labios humanos, especialmente en el bermellón que es considerado la zona de mayor sensibilidad táctil y térmica.

5.1.1. Piel

Las superficie cutánea de los labios contiene abundantes folículos pilosos con glándulas sebáceas asociadas. El aparato nervioso de los pelos configura complejos sistemas circulares formados por fibras nerviosas mielínicas y amielínicas en torno a la base de los folículos (**Figura 5.1.1.1a y b**). Muchas de esas fibras expresan la mecanoproteína PIEZO2 indicando que se trata de fibras nerviosas mecanosensibles; algunas de las células epiteliales de las bases de las papilas dérmicas también fueron PIEZO2 positivas (**Figura 5.1.1.1c**).

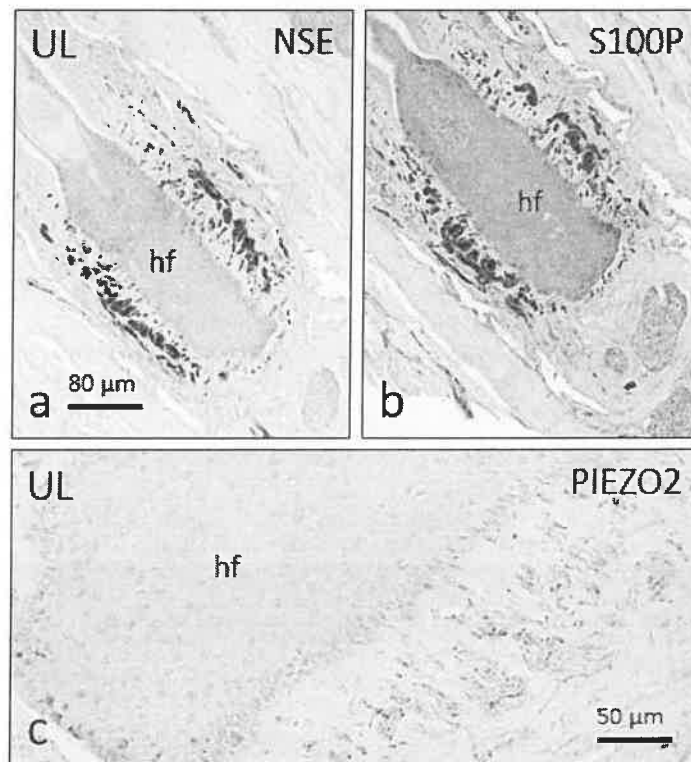


Figura 5.1.1.1- Secciones seriadas de dos folículos pilosos procesados para la detección de NSE (a) y S100P. El aparato nervioso de los pelos de la piel de los labios expresa la mecanoproteína PIEZO2. UL: labio superior; LL: labio inferior; hf: folículo piloso.

Asociados a la papila de los folículos pilosos, además de los complejos piloneuronales circulares, también se encuentran diferentes morfotipos de corpúsculos sensitivos (Figura 5.1.1.2a,d,e) especialmente de tipo Ruffini-like (Figura 5.1.1.2b,c,f,g). Consisten en una o más fibras nerviosas con trayectos variables y de diferentes calibres, envueltas en una cápsula bien diferenciada que, en ocasiones, delimita un espacio intracorpúscular está muy desarrollado.

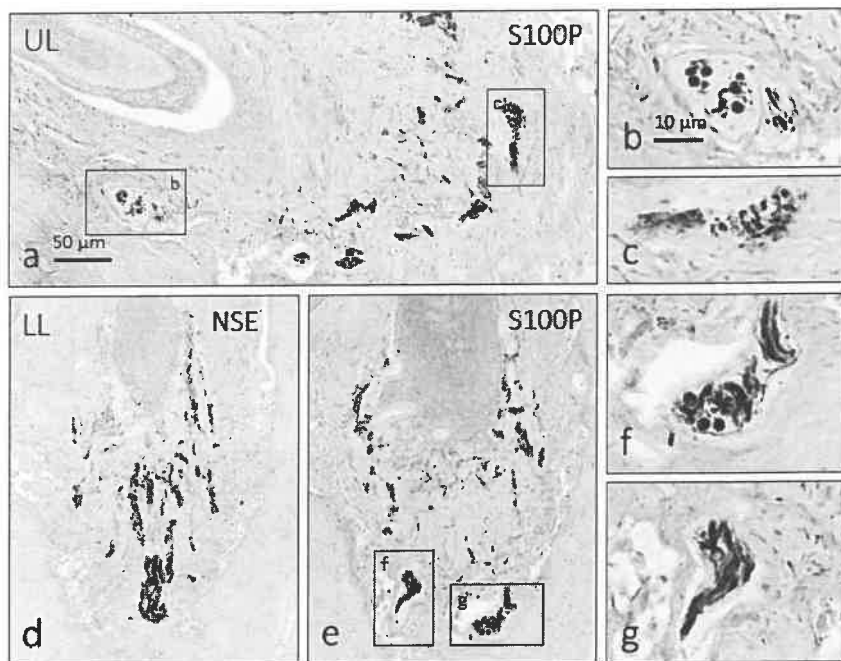


Figura 5.1.1.2.- Inervación del bulbo piloso y de la papila dérmica. Asociados con los segmentos profundos de la papila hay fibras nerviosas aisladas y formaciones nerviosas sensitivas de diferentes morfologías, muchas de ellas identificables con corpúsculos similares a Ruffini. UL: labio superior; LL: labio inferior.

5.1.2. Bermellón

Esta región labial está formada en su superficie por un epitelio de transición entre el de la piel de la cara externa y la mucosa de la cara interna. Está densamente inervado y en él se han encontrado, básicamente, dos tipos de formaciones nerviosas sensitivas corpusculares que difieren por su localización y relación con el epitelio, su morfología y el perfil inmunohistoquímico de las células gliales terminales.

El primer morfotipo, se encuentra localizado dentro de las papilas dérmicas, es de morfología irregular y en él predomina el eje perpendicular a la superficie. Estas

formaciones sensitivas pueden asimilarse a los **corpúsculos de Meissner** de la piel glabra (**Figura 5.1.2.1**, flechas negras) El segundo morfotipo, se localiza debajo del epitelio del bermellón, tiene aspecto ovalada y/o redondeado, estructuralmente es poco compacto y su tamaño es variable; son semejantes a los **corpúsculos glomerulares** descritos en otras regiones anatómicas (**Figura 5.1.2.1**, flechas blancas), y por analogía se le ha asignado la misma denominación.

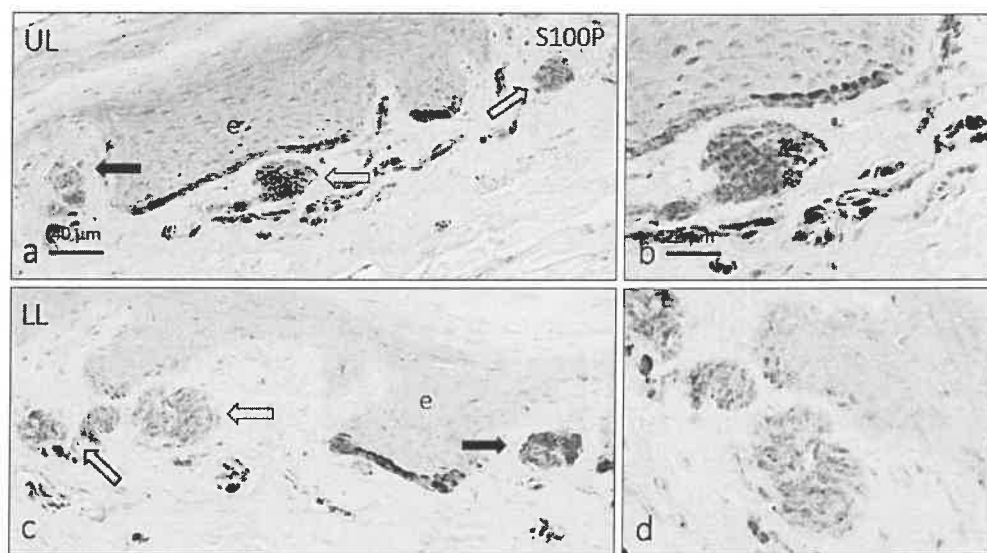


Figura 5.1.2.1.- Principales morfotipos de formaciones nerviosas sensitivas en el epitelio de transcripción cutánea-mucosa del bermellón. Se han observado corpúsculos de Meissner dentro de las papilas dérmicas (flechas negras) y glóbulos glomerulares subepidérmicos (flechas blancas). e: epidermis; ÚL: labio superior; LL: labio inferior.

Los **corpúsculos de Meissner** del bermellón, aunque por su morfología se asemejan a los típicos de la piel glabra, tienen una serie de características específicas que los diferencian de ellos. Las que se apreciaron de manera constante fueron las siguientes: los corpúsculos de Meissner de los labios no tienen células laminares compactas y la intensidad de inmunorreacción para la S100P es siempre menor que en las células de Schwann de las fibras nerviosas que los suplen. Además, el patrón de expresión de la NSE no sigue el típico del axón de ese tipo de corpúsculos, sino que es o más compacto o tiene un aspecto puntiforme (**Figura 5.1.2.2**). Sin embargo, igual que ocurre en los de la piel glabra, la mayoría de ellos tienen una cápsula completa o parcial, formada por células endoneurales CD34 positivas (**Figura 5.1.2.3**).

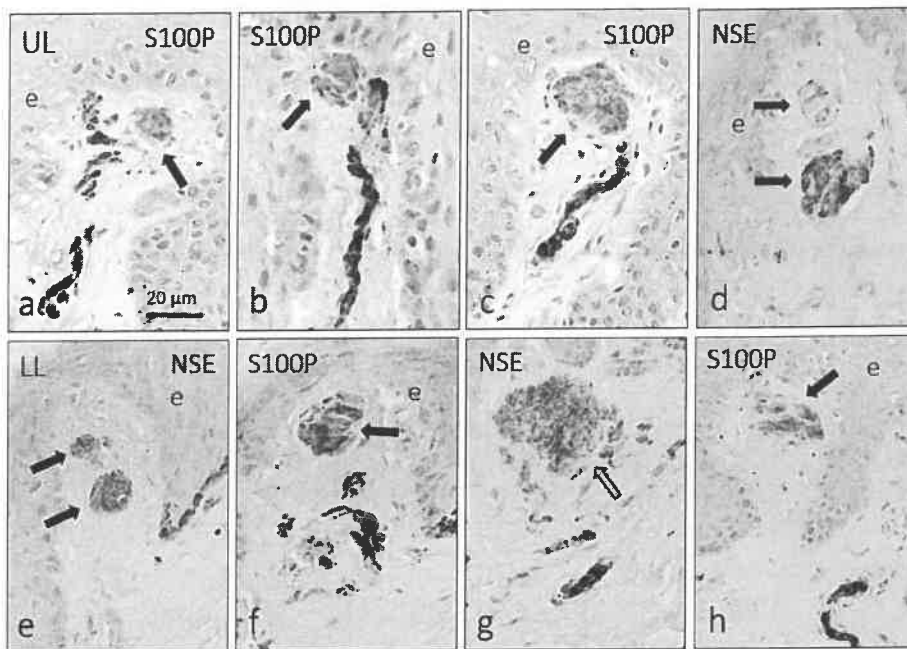


Figura 5.1.2.2. -. Diferentes morfotipos de corpúsculos de Meissner y glomerulares (flechas). La intensidad de la inmunorreacción para la proteína S100 fue más intensa en las células de Schwann de las fibras que llegan al corpúsculo que en las células gliales terminales corpusculares (células laminares). El inmunomarcaje para NSE mostró un patrón granular de distribución. e: epidermis; UL: labio superior; LL: labio inferior.

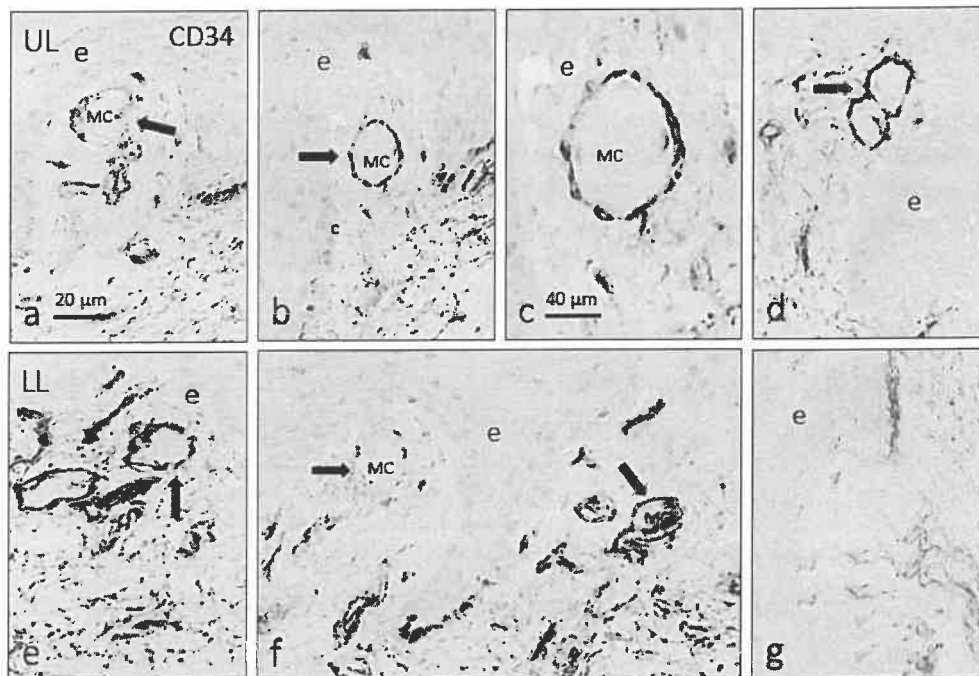


Figura 5.1.2.3.- Los corpúsculos sensitivos de Meissner y glomerulares (flechas) presentan una cápsula de endoneuro completa o incompleta de células CD-34 positivas. E: epidermis; UL: labio superior; LL: labio inferior.

En lo que se refiere a los **corpúsculos glomerulares**, presentan tanto axones como células gliales terminales poco densos, con patrones de marcaje para NSE y S100P puntiformes (Figuras 5.1.2.1 y 5.1.2.2e). Con carácter general, los corpúsculos glomerulares labiales carecen de cápsula.

Ni en los corpúsculos de Meissner ni en los glomerulares se observó inmunorreacción positiva para Glut-1, lo que indica que en la composición la cápsula corpuscular no participa el perineuro.

Cuando se trató de confirmar mediante doble inmunofluorescencia los resultados previos, las imágenes de microscopía confocal no fueron concluyentes debido a la poca intensidad de señal emitida por los fluorógenos y la citoarquitectura que presentaban los corpúsculos. De cualquier forma, el patrón de marcaje de NSE fue compatible con marcaje axónico, el de S100P con marcaje de glía terminal y el de CD34 con elementos capsulares (Figuras 5.1.2.4 y 5.1.2.5).

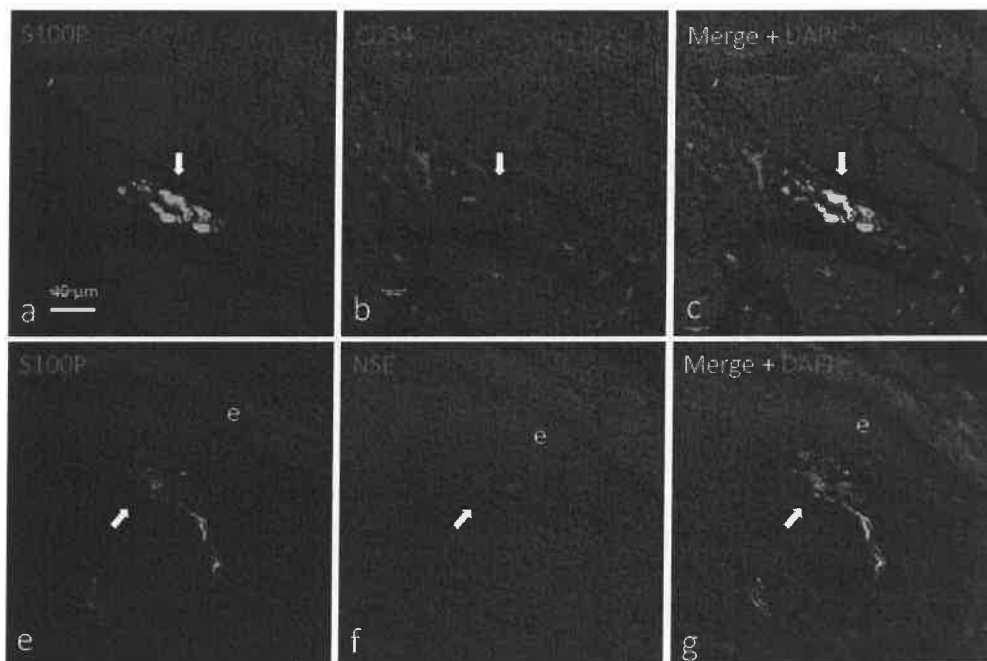


Figura 5.1.2.4.- Los corpúsculos sensitivos de Meissner y glomerulares (flechas) presentan una cápsula de endoneuro completa o incompleta de células CD-34 positivas. e: epidermis.

La detección de canales iónicos de diferentes familias en las células es un método indirecto de analizar a qué estímulos responden. Con esta finalidad se estudiaron en las secciones de labios humanos los canales iónicos mecanosensores ASIC2, TRPV4 y PIEZO2, así como los termosensores TRPV1, TRPM2 y TRPM8. Los resultados fueron negativos para TRPV4, TRPV1, TRPM2 y TRPM8 aunque no puede afirmarse si la negatividad es debida a razones técnicas (especialmente el inadecuado procesado de las piezas) o a la ausencia del antígeno que se pretendía identificar.

Sin embargo, si se detectaron ASIC2 y PIEZO2. Las formaciones nerviosas sensitivas que expresaban esas mecanoproteínas fueron corpúsculos de Meissner y corpúsculos glomerulares (**Figura 5.1.2.6**). En ellos el patrón de inmunomarcaje fue compatible con el de los axones de esas formaciones sensitivas. Además, y de manera ocasional, se encontró PIEZO2 en las células de Merkel de la base de los folículos pilosos (**Figura 5.1.2.6a**) y en terminaciones del aparato pilo-neural (**Figura 5.1.1.1**).

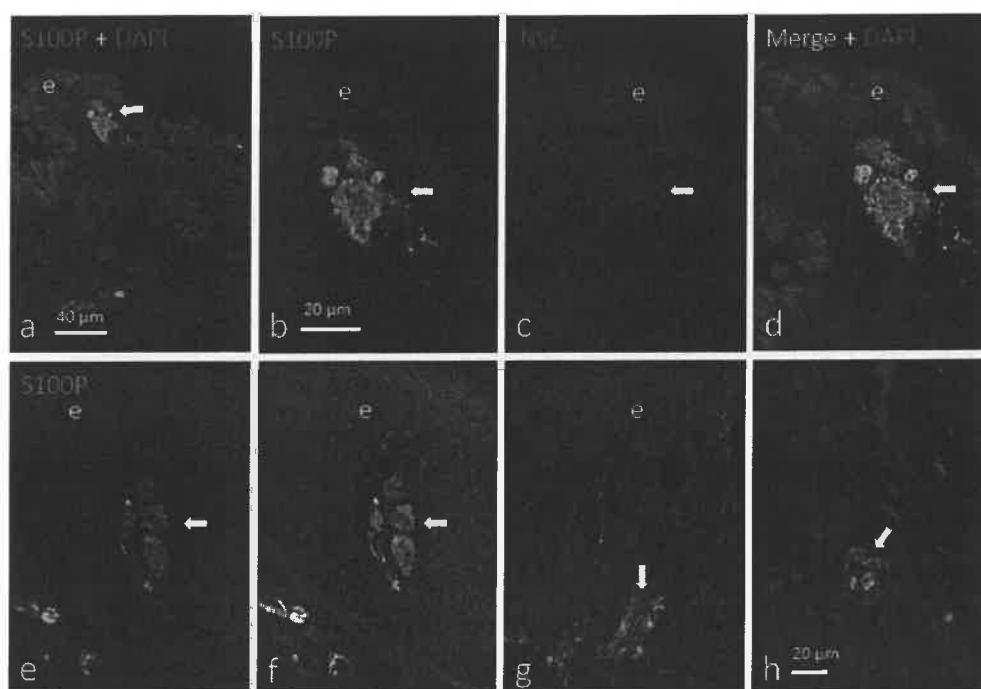


Figura 5.1.2.5.- Los corpúsculos sensitivos de Meissner del bermellón de los labios muestran inmunorreacción para NSE y S100, compatible con el marcaje de los axones y las células gliales terminales, respectivamente. e: epidermis; UL: labio superior; LL: labio inferior.

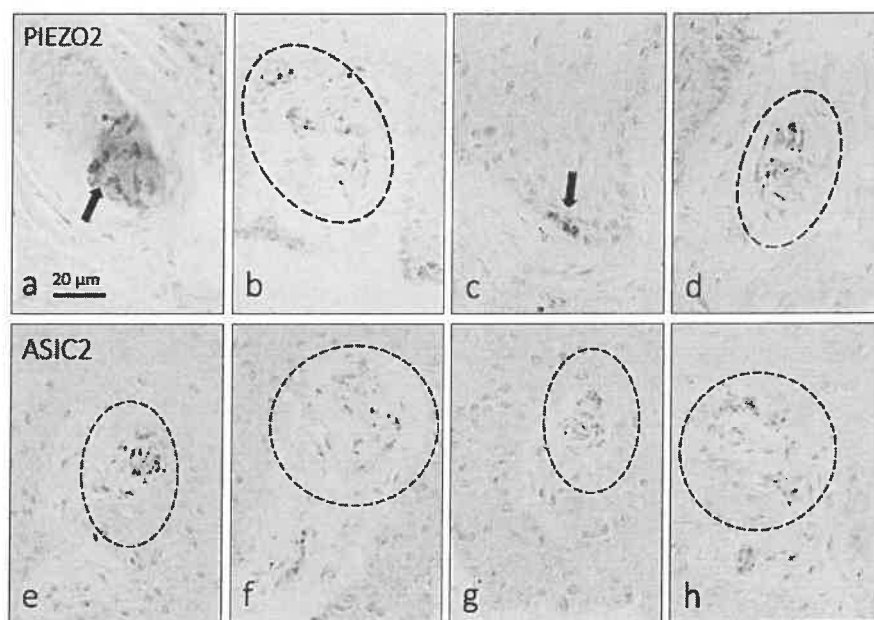


Figura 5.1.2.6.- Algunas células de Merkel asociadas a las papilas de los pelos (a, flecha) y en la capa basal de la epidermis (c) muestran inmunorreacción para PIEZO2, así como algunos corpúsculos de Meissner (b) y glomerulares (d). La inmunorreacción para ASIC2 se limitó a los axones de los corpúsculos de Meissner. e: epidermis.

Los resultados del análisis cuantitativo se resumen en la Tabla 5.1.2.1. Como se puede observar, y como regla general, en los segmentos central y medio de los labios la densidad de los corpúsculos glomerulares fue superior a la de corpúsculos de Meissner, mientras que en el segmento lateral predominaron los corpúsculos de Meissner; y la densidad de los corpúsculos, de manera global, fue mayor en el labio superior que en el labio inferior.

Tabla 5.1.2.1. Densidad de corpúsculos sensitivos en los labios humanos/mm². CM: corpúsculos de Meissner; CG: corpúsculos glomerulares

		Zona central	Zona media	Zona lateral
Labio superior	CM	4,35 ± 0,91	3,96 ± 1,02	4,12 ± 0,85
	CG	5,00 ± 1,32	5,34 ± 1,02	3,84 ± 0,95
Labio Inferior	CM	3,82 ± 0,86	3,76 ± 0,46	3,91 ± 0,77
	CG	4,26 ± 1,20	4,31 ± 0,93	3,56 ± 0,84

5.1.3. Mucosa

En los pliegues de la mucosa que tapiza la cara interna de los labios, también se han identificado formaciones nerviosas sensitivas (**Figura 5.1.3.1**), en número escaso y de morfotipos diferentes a los descritos en el bermellón. En algunos casos fueron semejantes a los corpúsculos glomerulares (**Figuras 5.1.3.1a y b**), en otros formaban complejas estructuras polilobuladas (**Figura 5.1.3.1d**), y en algunos casos asemejaban a terminaciones nerviosas libres (**Figuras 5.1.3.1e,f,g**). También se encontraron, muy ocasionalmente, formaciones sensitivas redondeadas en el interior de pliegues de la mucosa labial que asemejaban papilas gustativas (**Figuras 5.1.3.1h**). En ningún caso fueron estructuras capsuladas CD34 positivas.

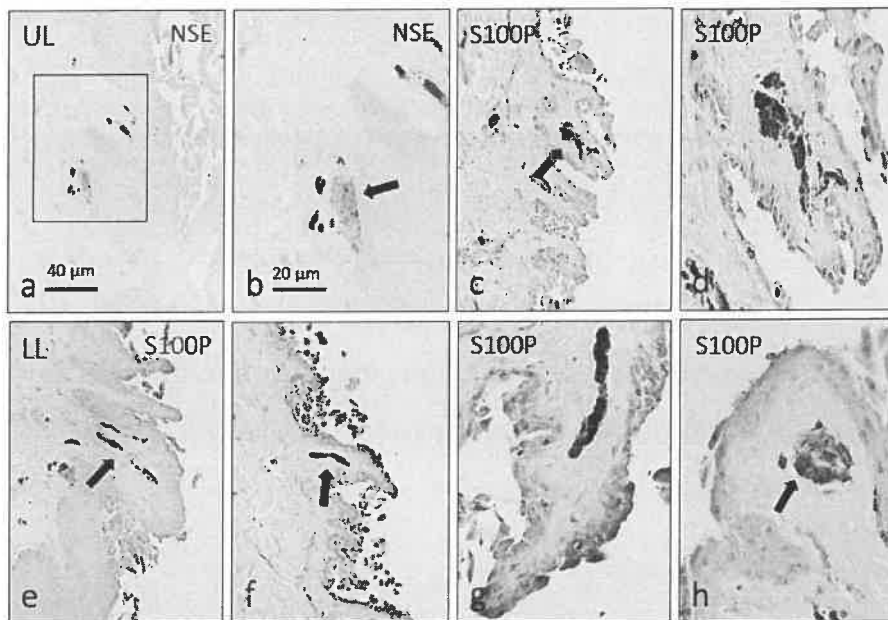


Figura 5.1.3.1.- Las formaciones nerviosas sensitivas de la mucosa de los labios (flechas) no presentaron un morfotipo equiparable a las del bermellón, y algunas podrían ser equivalentes a formaciones nerviosas libres. UL: labio superior; LL: labio inferior.

5.2. Inervación propioceptiva de los labios humanos

La descripción de los resultados que se realiza en los párrafos siguientes no tiene en cuenta los diferentes músculos de los labios, sino la presencia o no de propioceptores típicos, es decir, husos musculares, y otros morfotipos de formaciones nerviosas sensitivas capaces de funcionar como propioceptores. No obstante, en todas las piezas anatómicas estudiadas se confirmó en cortes histológicos la existencia de fibras musculares correspondientes al músculo *orbicularis oris* (Figuras 2.1.1 y 5.2.1).

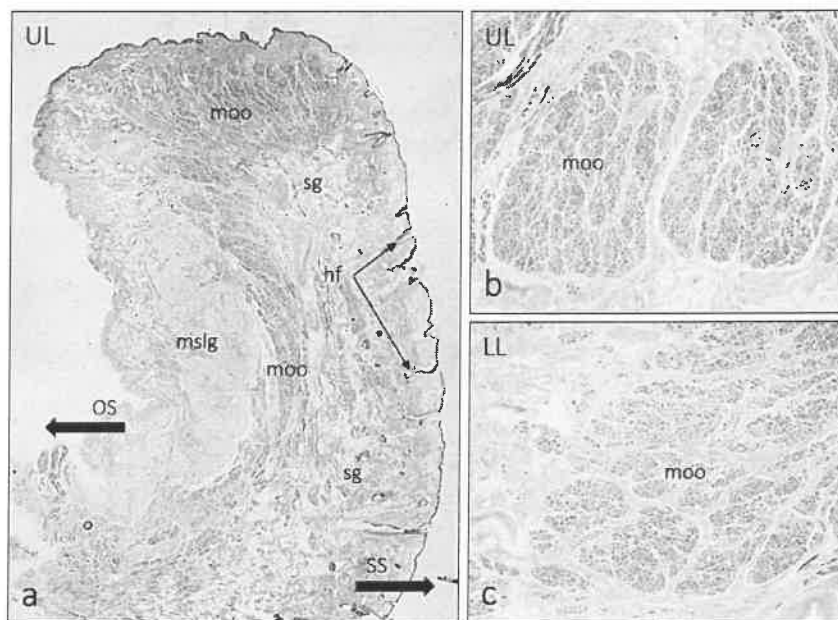


Figura 5.2.1.- Tinción de tricrómico de Masson de una sección del tercio medio del músculo orbicular del labio superior. OS: superficie oral; SS: superficie cutánea; moo: músculo orbicularis oris; sg: glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas; mslg: glándulas labiales secretoras de mucosa; hf: folículos pilosos.

La primera aproximación a los objetivos de esta parte de la Tesis consistió en localizar estructuras que fueran morfológicamente compatibles con husos neuromusculares. Sólo en dos secciones (se analizaron más de 200) de los tercios central e intermedio del labio superior, se observaron estructuras que se asemejan a husos neuromusculares (Figura 5.2.2a, flechas) considerando el tamaño-diámetro y la disposición de las fibras musculares. Sin embargo, en ninguna de las secciones analizadas se encontró inmunorreacción para la miosina de cadena pesada, considerada específica de las fibras intrafusales (Figura 5.2.2b), lo que descarta la presencia de estas estructuras en los labios humanos.

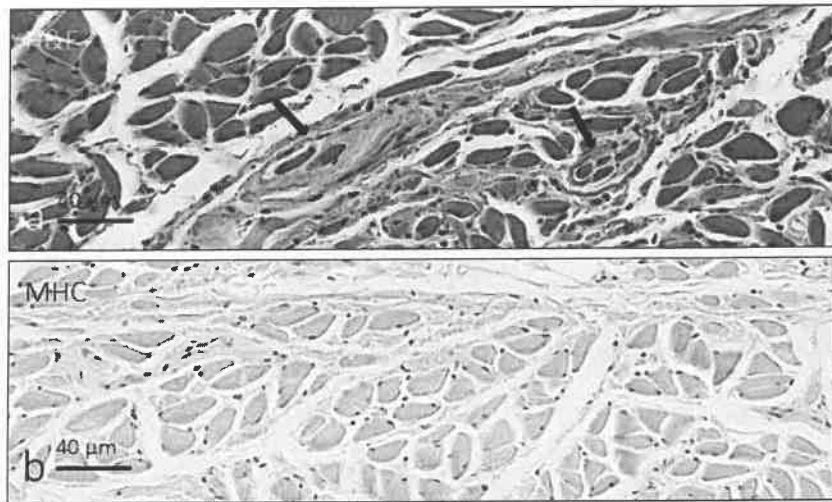


Figura 5.2.2.- Tinción de hematoxilina-eosina (a) e inmunohistoquímica (b) para la detección de la cadena pesada de miosina en el músculo orbicular labio superior. Ocasionalmente se observaron estructuras similares a los husos musculares (flechas en a), pero no se detectó ninguna reacción para la miosina de las fibras musculares de los husos.

Sin embargo, Mediante la inmunodetección de S100P se ha demostrado que los músculos de los labios humanos tienen una alta densidad de inervación, localizada principalmente en los tabiques del endomisio y perimisio así como en el tejido conectivo que separa los diferentes músculos (**Figura 5.2.3a**).

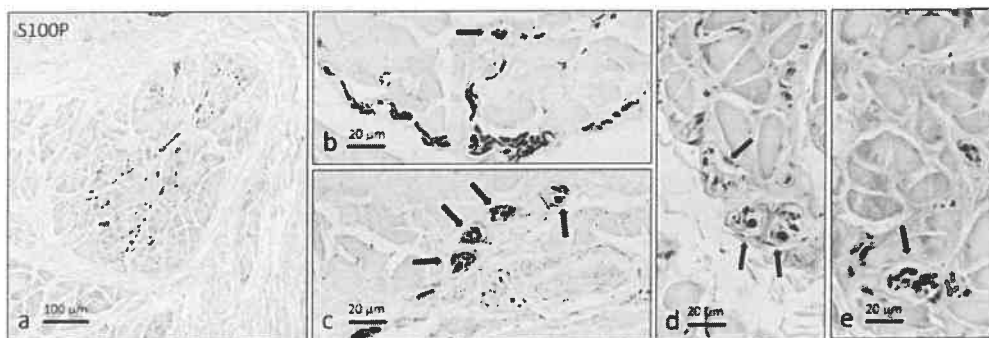


Figura 5.2.3.- Inmunohistoquímica para la detección de la proteína S100. Fascículo muscular correspondiente al músculo *orbicular oris del* labio inferior que muestra el sistema nervioso dentro de él (a). En los septos del perimisio hay formaciones nerviosas sensitivas con diferentes morfologías (flechas en b a e).

El aparato nervioso muscular de los labios aparece como fibras nerviosas aisladas (**Figura 5.2.3b**) y como formaciones encapsuladas que contienen fibras nerviosas de diferentes calibres; estas últimas son especialmente abundantes en la zona superficial de los fascículos musculares (**Figura 5.2.3c-e**).

A veces, las formaciones nerviosas sensitivas situadas en los tabiques conectivos de los labios pueden confundirse con los nervios. Sin embargo, su aspecto es muy diferente ya que los nervios están formados por grupos compactos de fibras nerviosas de calibres similares rodeadas directamente por capas de endoneuro-perineuro. Por el contrario, las formaciones nerviosas sensitivas contienen un pequeño número de fibras nerviosas gruesas y fibras, o solo una fibra gruesa y fibras de menor calibre, o varias fibras de pequeño calibre. En todos los casos estas formaciones tienen un amplio espacio delimitado por una cápsula (**Figura 5.2.4**).

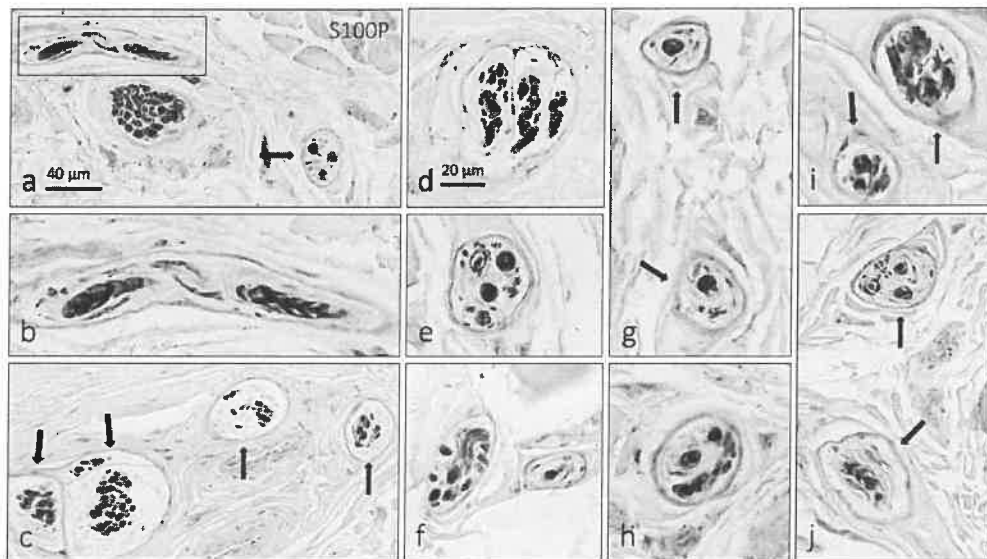


Figura 5.2.4.- Inmunohistoquímica para la demostración de la proteína S100. Diferentes morfotipos de formaciones nerviosas sensoriales en el perimysio de los músculos de los labios superiores (a-f) e inferiores (g-j). Ocasionalmente se observaron corpúsculos similares a los de Ruffini (i).

Ocasionalmente, se observaron formaciones nerviosas sensitivas similares a corpúsculos de Ruffini y Pacini-like (**Figura 5.2.4b e i**). Estos resultados se confirmaron mediante doble inmunofluorescencia observando el diferente calibre de las fibras nerviosas dentro de las formaciones nerviosas sensitivas y la delimitación del espacio por una cápsula más o menos completa de endoneuro CD34 positivo (la reacción para el antígeno perineural Glut1 fue negativa; datos no mostrados) (**Figura 5.2.5**).

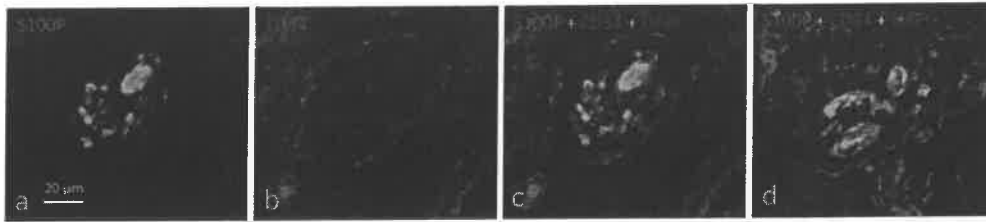


Figura 5.2.5.- Doble inmunofluorescencia para la proteína S100 (fluorescencia verde) y CD-34 (fluorescencia roja) contrateñida con DAPI (fluorescencia azul). Las imágenes muestran corpúsculos similares a los de Pacinian. Objetivo: aceite 63X/1.40, estenopeico 1.37, resolución XY 139.4 nm y resolución Z 235.8 nm.

Como ya se ha comentado previamente un método directo para poner en evidencia las formaciones mecanoceptivas-propioceptivas en los músculos esqueléticos, es la demostración en ellos de mecanoproteínas, especialmente PIEZO2. En secciones seriadas procesadas para la detección inmunohistoquímica de S100P y PIEZO2 se detectó la presencia de PIEZO2 en los axones de las formaciones nerviosas sensitivas de los labios (Figura 5.2.6) y en algunas fibras nerviosas aisladas.

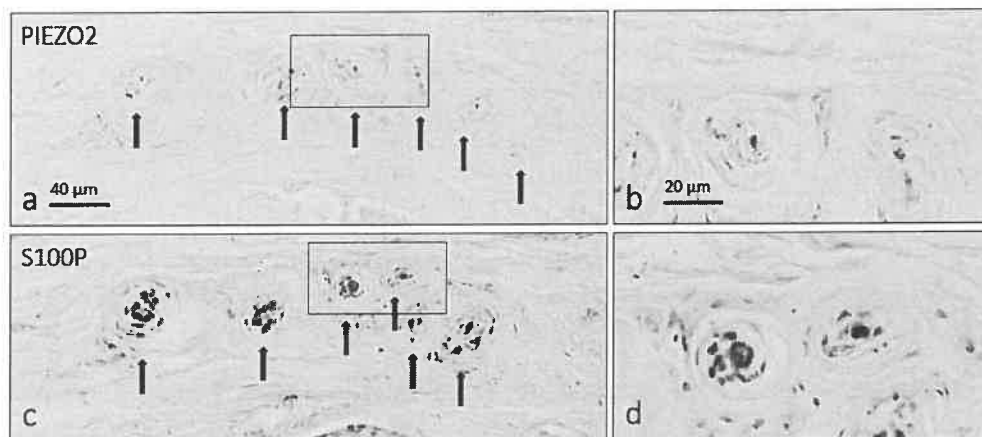


Figura 5.2.6.- Secciones seriadas que muestran la localización de la mecanoproteína PIEZO2 (a,b) y la proteína S100 (c,d) en las formaciones nerviosas sensitivas del labio superior humano (flechas). La inmunorreacción para PIEZO2 se localiza en los axones de las formaciones nerviosas sensitivas.

5.3. Distribución de CD44 en los labios humanos

Esta parte del estudio tuvo por finalidad estudiar la distribución de CD44, considerado como el principal receptor de membrana celular del ácido hialurónico, en los tejidos del labio.

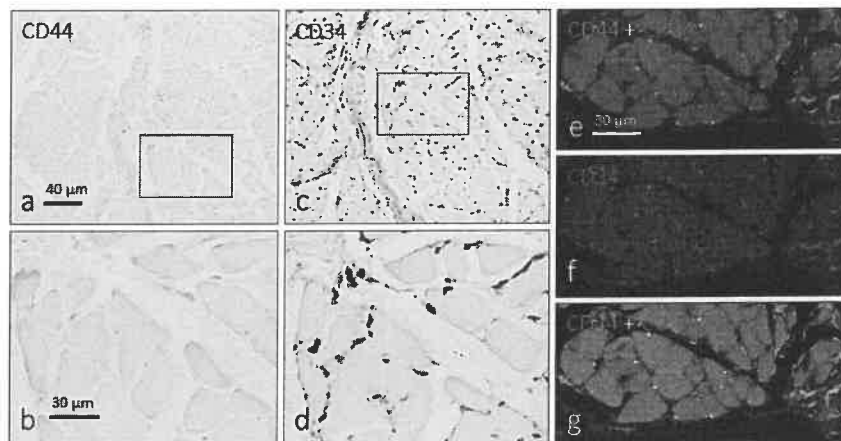


Figura 5.3.1.- Detección inmunohistoquímica de CD44 y CD34 en el músculo *orbicularis oris* de los labios humanos. Se detectó una débil expresión de CD44 (a y b) en algunas células del endomisio mientras que CD34 marca los pericitos (c y d). El doble inmunomarcaje demuestra la no colocalización de ambos antígenos.

Se puso especial atención en la posible presencia del mismo en los telocitos (identificados por su positividad para CD34) por la importancia que se expondrá en la Discusión dada la alta capacidad de diferenciación de estas células.

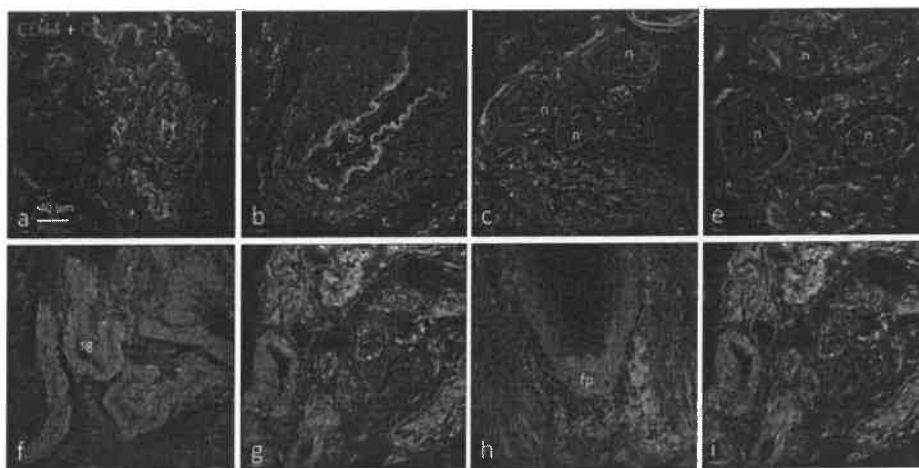


Figura 5.3.2.- Inmunofluorescencia para CD44 (verde) y CD34 en diferentes tejidos del labio humano. bv: vaso sanguíneo; fp: folículo piloso; n: nervio; sg: glándula submucosa.

La localización de CD44 en los tejidos de los labios fue ubicua, a excepción de las células musculares (**Figura 5.3.1**). En las secciones del músculo *orbicularis oris* se apreció una inmunorreacción muy débil en el endomisio y, de forma segmentaria, no uniforme ni continua. Además, el patrón de fluorescencia que se apreció, indica que CD44 se encuentra en los núcleos, y no es compatible con detección de la membrana celular. CD34, por su lado, marca los telocitos (o células fibroblastos-like) de la totalidad de los tejidos labiales, incluyendo el endomisio, pero nunca co-localizado con CD44.

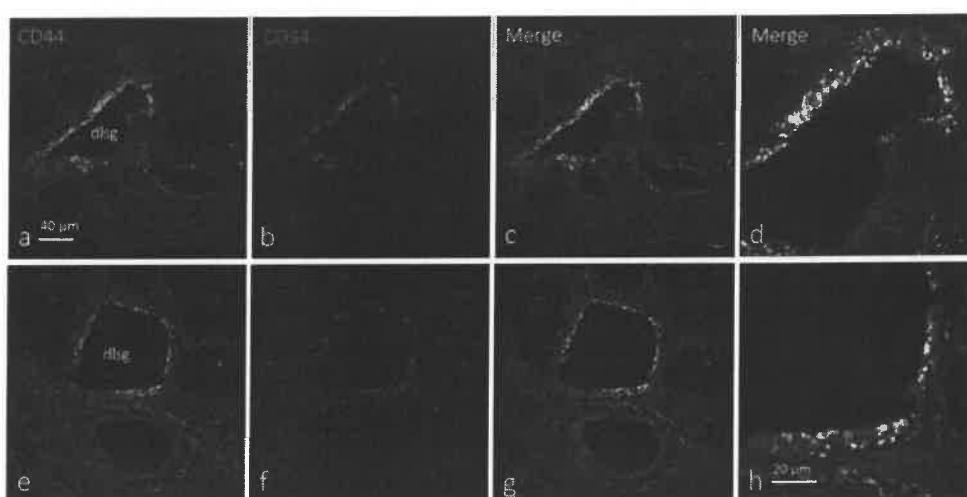


Figura 5.3.3.- Inmunofluorescencia para CD44 (verde) y CD34 en diferentes tejidos del labio humano. bv: vaso sanguíneo; fp: folículo piloso; n: nervio; sg: glándula submucosa. dls: conducto de glándula salival del labio.

Se detectó positividad para CD44, en la túnica muscular de las paredes de los vasos sanguíneos con independencia del calibre de los mismos; en el endoneuro de los troncos nerviosos, en la base de los folículos pilosos, en las células epiteliales que forman los Pacini y los conductos de los diferentes tipo de glándulas labiales (sebáceas, sudoríparas, labiales). En torno a todas esas poblaciones celulares se detectó CD34: adventicia vascular, endoneuro, telocitos subepiteliales y los de la papila de los folículos pilosos (**Figura 5.3.2**).

La única estructura en la que se detectó co-localización CD44-CD34 fue en células aisladas de los conductos excretores de glándulas salivales del labio (**Figura 5.3.3**). Teniendo en cuenta que las células positivas no tienen una localización concreta ni una morfología

bien definida, no se puede asegurar si se trata de células epiteliales o de otro tipo células (p.e. células mioepiteliales). No obstante, por el patrón de la inmunorreacción tampoco puede descartarse que se trate de una reacción inespecífica.

6. Discusión

6. Discusión

6.1. Consideraciones generales

Los labios son estructuras músculo-cutáneo-mucosas que rodean la cavidad oral y juegan un papel clave en funciones como la masticación, la expresión facial, la fonación, la sensación táctil y la conducta erótico-sexual. Además, participan en la mayoría de los reflejos orofaciales (ver Cattaneo y Pavesi, 2014; Frayne et al., 2016) .

El presente trabajo de investigación se diseñó para analizar la inervación de los labios humanos, con especial referencia al bermellón. Además, teniendo en cuenta que el estudio se relaciona directamente con la estética de la sonrisa, se ha incorporado un estudio preliminar sobre la distribución en los labios del principal receptor celular para el AH, el CD44. Para ello se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica asociadas a una batería de anticuerpos para identificar el axón (NSE y NFP), así como las células de Schwann y las células gliales terminales (S100P) de los nervios y las formaciones nerviosas sensoriales, respectivamente. Además, se estudió la distribución de marcadores de células endoneurales (CD34) y perineurales (Glut-1) en estas estructuras. Como evidencia indirecta de la posible función de las formaciones nerviosas sensitivas labiales, se estudió si alguno de sus componentes, especialmente los axones, expresaban algún canal iónico relacionado con la mecanosensación (ASIC2, PIEZO2 y TRPV4) o la termosensación (TRPV1, TRPM2 y TRPM8) (Cobo et al., 2021; Martin-Alguacil et al., 2021).

Consideramos que el perfecto conocimiento de la inervación de los labios, tanto somatosensorial como propioceptiva, puede proporcionar datos esenciales a los dentistas, cirujanos faciales, que manipulan los labios con finalidades telepáticas o estéticas (Baudoin et al., 2019; Wu et al., 2019; Sabbah, 2022)

6.2. Discusión de los resultados

Los estudios recientes sobre la inervación microscópica de los labios humanos son casi inexistentes, con la excepción del de Nolano et al. (2013). Estos autores, en muestras de biopsias de la labio superior obtenidas mediante punch, encontraron abundantes fibras

nerviosas intraepiteliales, complejos pilo-neurales de fibras no mielinizadas y mielinizadas y, ocasionalmente, corpúsculos similares a los de Meissner, complejos de células de Merkel-neurita y corpúsculos Ruffini-like. Nuestros resultados coinciden parcialmente con los de Nolano et al. (2013) ya que hemos encontrado corpúsculos tipo Ruffini asociados a la papila de los folículos pilosos, corpúsculos tipo Meissner en el bermellón y otras formaciones sensoriales de difícil filiación morfológica en la submucosa de la mucosa labial. Pero en ningún caso se han encontrado complejos de células de Merkel-neurita. Por otro lado, cabe destacar que Nolano et al. (2013) no describen la presencia de corpúsculos glomerulares que en nuestro estudio son abundantes. Seguramente estas discrepancias se pueden explicar porque hemos analizado labios enteros y son solo pequeñas muestras de biopsia labial obtenida de transición piel-bermellón.

En nuestro trabajo no se ha analizado la totalidad de la inervación de los pelos, limitándose únicamente a la papila y zonas próximas. Ello fue debido a que el aparato nervioso pilo-neural más superficial se afectó por el tratamiento de las piezas y se obtienen resultados inespecíficos cuando se aplican en ellos técnicas de inmunohistoquímica.

Existe un acuerdo casi unánime de que el bermellón es la parte más inervada de los labios (Rath y Essick, 1990) y nuestro trabajo se ha centrado en él. Los aferentes cutáneos, y presumiblemente también los del bermellón, se identifican en función de sus terminales sensitivos, o corpúsculos sensitivos, y clasificarse funcionalmente en función de la velocidad de conducción de sus potenciales de acción (Rice y Albrecht, 2008; Zimmerman et al., 2014; Cobo et al., 2021, Martín-Alguacil et al., 2021). En nuestro estudio hemos encontrado corpúsculos de Meissner y corpúsculos glomerulares; en general los primeros son más abundantes en el tercio externo de los labios y los segundos en los dos tercios internos. Por lo que conocemos, es la primera vez que se cuantifican los corpúsculos sensibles en bermellón, y se establece un patrón diferencial zonal entre los labios superior e inferior.

Los corpúsculos de Meissner encontrados en los labios fueron similares, pero no iguales, a los de la piel glabra de otras zonas, especialmente la digital (ver Cobo et al., 2021). Así, la glía terminal tiene una disposición irregular y no en "pila de monedas" y su inmunomarcaje típico con S100P mostró una intensidad mucho menor que la de las células de Schwann de las fibras nerviosas que los suplen. Aunque no podemos asegurarlo con certeza, es posible que existan diferencias en la glía terminal de los corpúsculos sensitivos según la región anatómica (Suazo et al., 2022). Por otro lado, los corpúsculos glomerulares sólo habían sido descritos previamente en los labios con técnicas de impregnación auro-argéntica, y se habían denominado "cuerpos glomerulares no encapsulados" y "terminaciones glomerulares capsuladas (cuerpo nervioso genital tipo I)" (Seto, 1963). Los hallazgos de nuestro estudio muestran que, efectivamente, no están encapsulados (carecen de envoltura celular CD34 o Glu-1 positiva) y se parecen morfológicamente a los que existen en el clítoris, aunque en esta ubicación sí tienen una cápsula (García-Mesa et al., 2021).

A nivel de la mucosa labial también hemos observado algunos tipos de formaciones nerviosas sensitivas en escaso número y de difícil filiación morfológica. Las formaciones nerviosas sensitivas predominantes fueron las fibras nerviosas libres de gran calibre, aunque también se encontraron formaciones complejas polilobuladas y estructuras parecidas a corpúsculos de Meissner y glomerulares. La posible función de estas formaciones sensitivas se desconoce y, a pesar de su morfología, debe demostrarse su posible función como mecanorreceptores.

Los morfotipos de corpúsculos sensitivos encontrados a nivel cutáneo en nuestros estudios (corpúsculos tipo Ruffini en relación con las papilas de los folículos pilosos), en el bermellón (corpúsculos de Meissner y glomerulares) y en la mucosa labial (no afiliada morfológicamente), podrían ser la evidencia morfológica de los resultados de los estudios de microneurografía que recogen LTMRs tipo II SA y AR tipo I. Sin embargo, nuestros resultados no apoyan el registro de LTMRs tipo I SA, es decir el que se origina en los complejos células de Merkel-neuritas (Trulsson y Johansson, 2002; Bukowska y et al., 2010; Trulsson et al., 2010). Por otro lado, no se sabe a qué categoría funcional se pueden atribuir los corpúsculos glomerulares y, en base a los resultados actuales, qué

corpúsculos son responsables de los LTMR de AR tipo II. Probablemente, la combinación de LTMR es la responsable última de la mecanosensibilidad de los labios.

La mecanotransducción en los corpúsculos sensitivos implica a canales iónicos mecanosensibles (Wu et al., 2017; Douguet y Honoré, 2019), que se han detectado tanto en los axones como en las células gliales terminales de los corpúsculos sensitivos cutáneos humanos (García-Mesa et al., 2017, 2021, 2022; Cobo et al., 2020). El axón de los corpúsculos Meissner y glomerulares en el bermellón, así como algunas células de Merkel asociadas a los pelos, muestran inmunorreactividad PIEZO2; y los axones de los corpúsculos de Meissner y glomerulares también para ASIC2. Ambos canales iónicos ya habían sido descritos en los axones de los corpúsculos de Meissner y los corpúsculos glomerulares en otras regiones cutáneas (Cabo et al., 2015; García-Mesa et al., 2017, 2021a, 2021b). Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que demuestra la presencia de ASIC2 y PIEZO2 en los corpúsculos sensitivos de los labios humanos, si bien a falta de posteriores estudios queda por establecer si PIEZO2 y ASIC2 se colocalizan en los mismos axones o representan dos poblaciones axónicas segregadas. En este sentido, datos recientes de nuestro laboratorio (P. Cuendias et al., datos no publicados) han puesto de manifiesto que una subpoblación de corpúsculos de Meissner digitales humanos posee poliinervación.

Es bien conocido que el bermellón posee una amplia capacidad discriminatoria para la detección de un amplio rango de temperaturas. Sin embargo, en nuestro trabajo hemos fracasado en el intento de demostrar la presencia en las formaciones sensitivas de los labios de canales iónicos relacionados con la termosensibilidad. Creemos que se trata de problema técnico relacionado con el tratamiento de los tejidos y los métodos de detección más que de la ausencia real de estos canales termosensibles.

Las aferentes en la piel facial, los labios y la mucosa bucal responden no solo al contacto con objetos ambientales, sino también al contacto entre los labios, los cambios en la presión del aire generados por los sonidos durante el habla y las deformaciones de la piel facial y la mucosa que acompañan a los movimientos de los labios y la mandíbula asociados con la masticación y la deglución. Por lo tanto, además de la información

exteroceptiva, estos aferentes proporcionan información propioceptiva (Trulsson et al., 2002). Aunque como se expondrá más adelante algunos autores afirman que los receptores cutáneos pueden contribuir a los procesos sensoriomotores del habla por la deformación facial durante el proceso, los datos al respecto no son concluyentes (Ito y Gomi, 2007).

El otro aspecto de la inervación de los labios analizada en el presente trabajo ha sido el de la inervación propioceptiva. El tono muscular de los músculos labiales depende de la inervación propioceptiva y de la presencia propioceptores. La ausencia de tono muscular determina la flacidez muscular y, en el caso de músculos labiales, cambios de expresión facial y alteraciones funcionales y estéticas.

Pero los músculos faciales humanos, incluidos los músculos labiales, no tienen propioceptores típicos, es decir, husos neuromusculares (Stål et al., 1987, 1990; Kamen y De Luca 1992; Happak et al., 1994). Por lo tanto, si los músculos de los labios tienen inervación propioceptiva deben poseer propioceptores alternativos a los husos neuromusculares. Otros músculos que reciben inervación motora por el nervio facial como el *platysma colli* (May et al., 2018,2022) si poseen husos neuromusculares típicos. Recientemente, Omstead et al. (2023) plantearon la hipótesis de que los músculos faciales contienen husos musculares, y predijeron que los humanos tendrían el mayor número, dado el papel que desempeñan nuestros labios en el habla. Sin embargo, un estudio en profundidad de los resultados de estos autores pone en evidencia que no hay husos neuromusculares en la mayoría de las especies estudiadas. Además, las imágenes que ilustran el trabajo son de muy escasa calidad técnica y la identificación de los propioceptores es más que dudosa ya que se basan exclusivamente en criterios morfológicos y no realizan ningún tipo de inmunomarcaje específico de las fibras musculares intrafusales. Nuestro grupo de trabajo ha investigado en varias ocasiones la presencia de husos neuromusculares en los músculos cefálicos humanos, y nunca los hemos encontrado (ver para una revisión Cobo et al., 2019, 2021). Por ello, nos planteamos la hipótesis de que otras formaciones nerviosas sensitivas, o elementos sensibles, deben funcionar como propioceptores en estos músculos.

En este trabajo de Tesis Doctoral se ha confirmado, mediante técnicas estructurales e inmunohistoquímicas, la ausencia de husos musculares en los músculos labiales humanos. No se han encontrado formaciones con organización de husos musculares y nunca se detectó inmunorreactividad para la cadena pesada de miosina (considerada un marcador específico para las fibras intrafusales; Liu et al., 2002). Por el contrario, se observó un rico aparato nervioso sensitivo distribuido en el perimio y los tabiques conectivos de los labios que podría funcionar como un sistema propioceptivo. Se trata de fibras nerviosas de diferentes calibres incluidas en una cápsula endoneurial, con un gran espacio intracapsular, que en algunos casos se asemejaban a corpúsculos sensitivos de tipo Ruffini y Pacini. En nuestra opinión, estos dos morfotipos de estructuras sensoriales, y las otras que no se pueden filiar morfológicamente, podrían funcionar como propioceptores en los labios. Se ha propuesto que algunos tipos de mecanorreceptores cutáneos también pueden funcionar como propioceptores de los músculos faciales, pero sus propiedades fisiológicas sugieren que no son la alternativa a los husos neuromusculares (ver Proske y Gandevia, 2012).

Como se ha reiterado a lo largo de este trabajo, en el origen de todas las modalidades sensoriales hay canales iónicos y, por lo tanto, en la base de la mecanosensibilidad, incluida la propiocepción, es de esperar que intervengan canales iónicos mecanosensibles (Bewick y Banks, 2015; Kröger, 2018). Los canales iónicos ASICs (en especial ASIC2), TRPV4 y PIEZO2 son los principales candidatos para iniciar la mecanotransducción para la propiocepción y se han detectado en los husos musculares y (Simon et al., 2010; Chen y Wong, 2013; Woo et al., 2015; Nagel y Chesler, 2022). En el presente estudio hemos encontrado que la mayoría de las formaciones nerviosas sensitivas identificadas como posibles propioceptores, expresan PIEZO2 en sus axones lo que apoya casi de manera definitiva que funcionan como mecanorreceptores-propioceptores.

En conjunto, pues, todos los resultados anteriores demuestran que los músculos de los labios humanos carecen de propioceptores típicos, pero poseen un denso aparato nervioso sensitivo que puede funcionar, al menos en parte, como propioceptor. Los músculos periorales tienen una función mimética y estética especiales, y el perfecto

conocimiento de su anatomía e inervación es esencial para realizar los tratamientos sobre ellos correctamente (Hotta, 2016; Hwang, 2020; Morena Serna et al., 2021).

Se ha incluido en esta Tesis un estudio sobre la distribución del receptor de membrana CD44 en los labios humanos. Ello por dos motivos: el primero para establecer qué células de todos los tejidos labiales son dianas potenciales del AH; y el segundo, porque se conoce que el AH puede regular la inervación de los tejidos. HA es uno de un grupo de polisacáridos que se encuentran típicamente en los tejidos conectivos de los vertebrados; originalmente conocidos como mucopolisacáridos ácidos, en la actualidad se etiquetan como glicosaminoglicanos (Fraser et al., 1997). HA está formado por unidades repetidas disacáridos de N-acetil-D-glucosamina y ácido D-glucurónico y está muy abundantemente presente en la matriz extracelular (ECM). Los tamaños de los polímeros de HA varían de 5^3 a 2^7 Da in vivo, y las funciones de HA están dictadas en gran medida por su tamaño (Zhu et al., 2019). De hecho, se considera que los efectos biológicos del AH mediados por CD44 solo se desencadenan cuando se liga a cadenas largas.

La inyección de AH es un procedimiento mínimamente invasivo para el rejuvenecimiento facial que consiste en inyectar materiales de relleno para corregir el volumen o aumentar áreas específicas de la cara. El ácido hialurónico se utiliza para mejorar la cantidad de agua en la matriz extracelular ya que se trata de una molécula altamente hidrófila. Pero además se ha observado mediante examen histológico que el relleno dérmico con fragmentos de HA mediante inyección de dermis produce un aumento de la actividad de los fibroblastos con incremento en la producción de colágeno reticular tipo III, potencia la angiogénesis y aumenta el grosor de la epidermis (Scarano et al., 2021). Todas estas propiedades hacen del AH un excelente estimulante dérmico, capaz de corregir los defectos de los tejidos blandos de la cara y favorece la síntesis de colágeno, lo que lleva a efectos de rejuvenecimiento cutáneo (Stern et al., 2008). Además existen evidencias de que derivados del AH, tópicos o inyectados, tienen efectos variables en la restauración de un microambiente fisiológico e hidratado típico de la piel joven (Andre, 2008; Williams et al., 2009).

En nuestro estudio se ha puesto un especial interés en ver si CD44 se expresaba en los telocitos CD34 positivos de los labios, Estas células están involucradas en la organización tisular y el control de la matriz extracelular, el soporte estructural, la creación de microambientes, la comunicación intercelular, la inmunomodulación e inmunovigilancia, la inhibición de la apoptosis y el control, la regulación y la fuente de otros tipos celulares. Por lo tanto, los telocitos participan en la homeostasis tisular, la morfogénesis, la regeneración y la reparación (Díaz-Flores et al., 2016, 2021).

Nuestros resultados demuestran que CD44 se expresa de forma ubicua en los tejidos y células diferenciadas de los labios, pero no en los telocitos. Este hecho es de capital importancia porque estas células tienen gran capacidad proliferativa y de diferenciación. Si los telocitos fueran CD44 positivos podrían proliferar y desencadenar procesos cicatriciales o de obliteración vascular por crecimiento de la adventicia. Los estudios preliminares de nuestro grupo (Martín-Cruces et al., datos no publicados) de caracterización de los telocitos en la dermis y sistema músculo-aponeurótico superficial de la cara (mediante la detección de desmina, nestina, vimentina, $PGFR\alpha$ y β) parecen confirmar que los telocitos no responden al AH. En cuanto a los nervios faciales, cualquiera de los tipos celulares que los forman podrían responder al AH; por tanto, deben manejarse con cuidado las infiltraciones de AH para evitar producir neuropatías periféricas por este tipo de actuaciones terapéuticas.

6.3. Limitaciones del estudio y perspectivas de futuro

Los resultados del presente estudio están limitados por varios aspectos entre los que cabe destacar el tamaño de la muestra y los resultados negativos obtenidos con algunos anticuerpos, pero los hallazgos sobre la inervación somatosensorial y la inervación propioceptiva han logrado los objetivos propuestos y ratificar estudios previos de nuestro grupo (Cobo et al., 2017b, 2021).

El escaso número de muestras analizado está en relación con la extensión de las secciones que se obtienen y, consecuentemente, con la cantidad de anticuerpos que consumen. Es cierto que se podían haber seleccionados sólo algunas muestras de

regiones concretas de los labios, pero los resultados hubieran dependido de que en esa zona hubiera o no formaciones nerviosas sensitivas.

En cuanto a los resultados negativos obtenidos con algunos anticuerpos, creemos que puede ser debido a que el procesado-fijación de los tejidos no fue el más adecuado. Es bien conocido que los grupos aldehído del formol enmascaran epítomos de los neurofilamentos y ello podría ser la causa de los resultados negativos para este antígeno. Los anticuerpos anti-TRPM2 y anti-TRPM8 nunca habían sido probados en tejidos humanos fijados y desconocemos si la fijación está detrás de los resultados negativos. Por el contrario, a pesar de los resultados negativos para TRPV1 y TRPV4, estudios previos de nuestro grupo han logrado marcajes positivos específicos en muestras de piel humana glabra (García-Mesa et al., 2022).

Por ello, en los próximos estudios del laboratorio del Grupo SINPOs se insistirá en el estudio de la somatosensación labial, especialmente la térmica, para tratar de solventar las cuestiones que han quedado sin resolver en este trabajo.

7. Conclusiones

7. Conclusiones

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

- 1.- Los folículos pilosos de la piel hirsuta de los labios tienen asociados a la dermis papilar corpúsculos de tipo Ruffini-like y paciniformes.
- 2.- En el bermellón se han identificado dos morfotipos de corpúsculos sensitivos: corpúsculos de Meissner y corpúsculos glomerulares, con diferentes patrones de densidad y localización en los labios superior e inferior. En los segmentos central y medio de los labios predominan los corpúsculos glomerulares, mientras que en el segmento lateral predominaron los corpúsculos de Meissner; la densidad de los corpúsculos, de manera global, fue mayor en el labio superior que en el labio inferior.
- 3.- Los corpúsculos de Meissner son capsulados, tienen una citoarquitectura y patrón de inmunomarcaje distintos de los de la piel glabra de otras localizaciones anatómicas. Sus axones presentan inmunorreacción para ASIC2 y PIEZO2.
- 4.- Los corpúsculos glomerulares son acapsulados, y tienen una citoarquitectura semejante a este tipo corpuscular de otras localizaciones anatómicas, especialmente genitales. Sus axones presentan inmunorreacción para ASIC2 y PIEZO2.
- 5.- Las células de Merkel en relación con las papilas expresan inmunorreacción para la mecanoproteína PIEZO2.
- 6.- La inervación propioceptiva de los labios humanos, especialmente el músculo *orbicularis oris*, está representada por distintos morfotipos de corpúsculos sensitivos, incluidos algunos de tipo Ruffini-like y Pacini-like, con axones PIEZO2 positivos. En los músculos labiales no hay husos neuromusculares.

6.- El receptor para el ácido hialurónico CD44 se expresa de manera ubicua en todos los tejidos labiales diferenciados, pero no en los telocitos CD34 positivos. Ello sugiere que a nivel de los labios el ácido hialurónico no tiene efectos proliferativos ni de diferenciación celular.

7. Concluding remarks

After a detailed analysis of the results and the timely discussion of them, we have reached the following conclusions:

1. The hair follicles of the hairy skin of the lips have Ruffini-like and Pacinian corpuscles associated to the dermal papillae.
2. In vermillion, two morphotypes of sensory corpuscles have been identified: Meissner's corpuscles and glomerular corpuscles, with different patterns of density and location in the upper and lower lips. In the central and middle segments of the lips glomerular corpuscles predominate, while in the lateral segment the Meissner corpuscles predominated; the density of the corpuscles, overall, was higher in the upper lip than in the lower lip
3. Meissner's corpuscles are capsulated, have a cytoarchitecture and immunolabelling pattern distinct from those of the glabrous skin in other anatomical regions. Its axons have immunoreaction to ASIC2 and PIEZO2.
4. The glomerular corpuscles are capsulated and have a cytoarchitecture like that of other anatomical locations, especially genital. Its axons have immunoreactivity for ASIC2 and PIEZO2.
5. Merkel cells related to hair dermal papillae express immunoreactivity for the mechanoprotein PIEZO2.
6. The proprioceptive innervation of human lips, especially the orbicularis oris muscle, is represented by distinct morphotypes of sensory corpuscles, including some Ruffini-like and Pacini-like types, with positive PIEZO2 axons. In the labial muscles there are no muscle spindles.

6. The receptor for hyaluronic acid CD44 is ubiquitously expressed in all differentiated labial tissues but not in CD34 positive telocytes. This suggests that in the lips hyaluronic acid has no proliferative or cell differentiation effects.

8. Bibliografía

8. Bibliografía

- Alsaad K, Lee T C, McCartan B: An anatomical study of the cutaneous branches of the mental nerve. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 32: 325-33.
- Avenoso A, D'Ascola A, Scuruchi M, Mandraffino G, Calatroni A, Saitta A, Campo S, Campo GM. Hyaluronan in Experimental Injured/Inflamed Cartilage: In Vivo Studies. *Life Sci.* 2018; 193: 132-40.
- Baudoin J, Meuli JN, di Summa PG, Watfa W, Raffoul W. A comprehensive guide to upper lip aesthetic rejuvenation. *J Cosmet Dermatol.* 2019; 18 :444-50.
- Beasley KL, Weiss MA, Weiss RA. Hyaluronic acid fillers: a comprehensive review. *Facial Plast Surg.* 2009; 25: 86-94.
- Bewick GS, Banks RW. Mechanotransduction in the muscle spindle. *Pflugers Arch.* 2015; 467:175-90.
- Biglioli F, Allevi F. V to VII Nerve Transfer for Smile Reanimation. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2023; 31:19-24.
- Boson AL, Boukovalas S, Hays JP, Hammel JA, Cole EL, Wagner RF Jr. Upper Lip Anatomy, Mechanics of Local Flaps, and Considerations for Reconstruction. *Cutis.* 2021; 107:144-8.
- Boukovalas S, Boson AL, Hays JP, Malone CH, Cole EL, Wagner RF. A Systematic Review of Lower Lip Anatomy, Mechanics of Local Flaps, and Special Considerations for Lower Lip Reconstruction. *J Drugs Dermatol.* 2017; 16:1254-61.
- Bravo B, Correia P, Gonçalves Junior JE, Sant'Anna B, Kerob D. Benefits of topical hyaluronic acid for skin quality and signs of skin aging: From literature review to clinical evidence. *Dermatol Ther.* 2022; 35: e15903.
- Bukowska M, Essick GK, Trulsson M. Functional properties of low-threshold mechanoreceptive afferents in the human labial mucosa. *Exp Brain Res.* 2010; 20:59-64.
- Bukhari SNA, Roswandi NL, Waqas M, Habib H, Hussain F, Khan S, Sohail M, Ramli NA, Thu HE, Hussain Z. Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *Int J Biol Macromol.* 2018; 120 (Pt B): 1682-95.
- Cattaneo L, Pavesi G. The facial motor system. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014; 38: 135-59.
- Chen CC, Wong CW. Neurosensory mechanotransduction through acid-sensing ion channels. *J Cell Mol Med.* 2013; 17:337-49.
- Chiu A, Fabi S, Dayan S, Nogueira A. Lip Injection Techniques Using Small-Particle Hyaluronic Acid Dermal Filler. *J Drugs Dermatol.* 2016; 15: 1076-82.
- Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Díaz-Flores L Jr, Gómez MG, Sáez FJ, Madrid JF. Behaviour of telocytes during physiopathological activation. *Semin Cell Dev Biol.* 2016; 55:50-61.

- Díaz-Flores L, Gutiérrez R, García MP, González-Gómez M, Rodríguez-Rodríguez R, Hernández-León N, Díaz-Flores L Jr, Carrasco JL. Cd34+ Stromal Cells/Telocytes in Normal and Pathological Skin. *Int J Mol Sci.* 2021; 22: 7342.
- Cobo JL, Abbate F, de Vicente JC, Cobo J, Vega JA. 2017. Searching for proprioceptors in human facial muscles. *Neurosci Lett.* 2017a; 640: 1-5.
- Cobo JL, Junquera S, Solé-Magdalena A, García-Suarez O, Cobo T. Proprioceptors in cephalic muscles. In: *Proprioception.* J.A. Vega and J. Cobo Eds. IntechOpen, London, 2021. doi.org/10.5772/intechopen.96794
- Cobo JL, Solé-Magdalena A, Junquera S, Cobo T, Vega JA, Cobo J. The Proprioception in the Muscles Supplied by the Facial Nerve. In: *Selected topics in facial nerve disorders.* I. Al-Zawaini and M. Jalal Hussein Eds. InTech, London, 2019. DOI: 10.5772/intechopen.84463
- Cobo JL, Solé-Magdalena A, Menendez I, De Vicente JC, Vega JA. Connections between the facial and trigeminal nerves: Anatomical basis for facial muscle proprioception. *JPRAS Open.* 2017b; 12:9-18.
- Cobo R, García-Piqueras J, Cobo J, Vega JA. The Human Cutaneous Sensory Corpuscles: An Update. *J Clin Med.* 2021; 10:227.
- Cobo R, García-Piqueras J, García-Mesa Y, Feito J, García-Suárez O, Vega JA. Peripheral Mechanobiology of Touch-Studies on Vertebrate Cutaneous Sensory Corpuscles. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 6221.
- DeJoseph LM, Agarwal A, Greco TM. Lip Augmentation. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2018; 26:193-203.
- Fagien S, Bertucci V, von Grote E, Mashburn JH. Rheologic and Physicochemical Properties Used to Differentiate Injectable Hyaluronic Acid Filler Products. *Plast Reconstr Surg.* 2019; 143: 707e-20e.
- Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: Its Nature, Distribution, Functions and Turnover. *J Intern Med.* 1997; 242: 27-33.
- Frayne E, Coulson S, Adams R, Croxson G, Waddington G. Proprioceptive ability at the lips and jaw measured using the same psychophysical discrimination task. *Exp Brain Res.* 2016; 234, 1679-87.
- Happak W, Burggasser G, Liu J, Gruber H, Freilinger G. Anatomy and histology of the mimic muscles and the supplying facial nerve, *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1994; 1994: S85-S86.
- Holden ACL. Consumed by prestige: the mouth, consumerism and the dental profession. *Med Health Care Philos.* 2020; 23:261-8.
- 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.
- Hotta TA. Understanding the Perioral Anatomy. *Plast Surg Nurs.* 2016; 36:12-8.

- Hu KS, Kwak HH, Song C, Kang HJ, Kim C, Fontaine C, Kim HJ. Branching patterns of the infraorbital nerve and topography within the infraorbital space. *J Craniofac Surg.* 2006; 17: 1111-5.
- Hu KS, Kwak J, Koh KS, Abe S, Fontaine C, Kim HJ. Topographic distribution area of the infraorbital nerve. *Surg Radiol Anat.* 2007a; 29: 383-8.
- Hu KS, Yun HS, Hur MS, Kwon HJ, Abe S, Kim HJ. Branching patterns and intraosseous course of the mental nerve. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007b; 65: 2288-94.
- Hur MS, Hu KS, Park JT, Youn KH, Kim HJ. 2010. New anatomical insight of the levator labii superioris alaeque nasi and the transverse part of the nasalis. *Surg Radiol Anat.* 2010; 32: 753-6.
- Hwang K. Periorbital and Perioral Regions in Relation to Aging. *J Craniofac Surg.* 2020; 31: e676-e9.
- Hwang K, Jin S, Hwang SH, Chung IH. Innervation of upper orbicularis oris muscle. *J Craniofac Surg.* 2006; 17: 1116-7.
- Hwang K, Jin S, Park JH, Chung IH. Cutaneous distribution of zygomaticofacial nerve. *J Craniofac Surg.* 2007; 18: 575-7.
- Hwang K, Suh MS, Chung IH. Cutaneous distribution of infraorbital nerve. *J Craniofac Surg.* 2004; 15: 3-5.
- Iyomasa MM, König B Jr, Watanabe IS. About the existence and endings of nerve fibres in the *Cebus apella* monkey's upper lip. *Rev Bras Pesqui Med Biol.* 1978; 11:209-12.
- Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:435-61.
- Kamen G, De Luca CJ. Firing rate interactions among human orbicularis oris motor units. *Int J Neurosci.* 1992; 64: 167-75.
- 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.
- Kar M, Muluk NB, Bafaqeeh SA, Cingi C. Is it possible to define the ideal lips? *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2018; 38: 67-72.
- Kokich VO, Kiyak HA, Shapiro PA. Comparing the perception of dentists and lay people to altered dental esthetics. *J Esthet Dent.* 1999;11: 311-24.
- Kröger S. Proprioception 2.0: novel functions for muscle spindles. *Curr Opin Neurol.* 2018; 31:592-8.
- Lazarov NE. Neurobiology of orofacial proprioception. *Brain Res Rev.* 2007; 56: 362-83.
- Liu X, Daugherty R, Konofaos P. Sensory Restoration of the Facial Region. *Ann Plast Surg.* 2019; 82: 700-7.
- Liu JX, Eriksson PO, Thornell LE, Pedrosa-Domellöf F. Myosin heavy chain composition of muscle spindles in human biceps brachii. *J Histochem Cytochem.* 2002; 50: 171-83.
- Machado AW. 10 commandments of smile esthetics. *Dental Press J Orthod.* 2014; 19: 136-57.
- Matthews TG. The anatomy of a smile. *J Prosthet Dent.* 1978; 39:128-34.

- Martin-Alguacil N, de Gaspar I, Schober JM, Pfaff DW, Vega JA. Somatosensation. En: Neuroscience in the 21st Century. Donald W. Pfaff and Nora D. Volkow Eds. Springer Science+Business Media. New York 2021.
- Marur T, Tuna Y, Demirci S. Facial anatomy. Clin Dermatol. 2014; 32:14-23.
- May A, Bramke S, Funk RHW, May CA. The human platysma contains numerous muscle spindles. J Anat. 2018; 232: 146-51.
- May CA, Mätz-Rensing K, Aschoff D, Bramke S. Muscle spindles in the rhesus monkey platysma. J Anat. 2022; 240: 936-40.
- Morera Serna E, Serna Benbassat M, Terré Falcón R, Murillo Martín J. Anatomy and Aging of the Perioral Region. Facial Plast Surg. 2021; 37:176-93.
- Nagel M, Chesler AT. PIEZO2 ion channels in proprioception. Curr Opin Neurobiol. 2022; 75:102572.
- Neilson PD, Andrews G, Guitar BE, Quinn PT. Tonic stretch reflexes in lip, tongue and jaw muscles. Brain Res. 1979; 178: 311-27.
- 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.
- Omstead KM, Williams J, Weinberg SM, Marazita ML, Burrows AM. Mammalian facial muscles contain muscle spindles. Anat Rec (Hoboken). 2023; DOI: 10.1002/ar.25172.
- Park JA, Rho NK, Lee HI, Yeo IS, Koh KS, Song WC. Are There Other Muscle Fibers on the Orbicularis Oris Muscle in the Upper Lip? Plast Reconstr Surg. 2022; 150: 1314e-21e.
- Pessa JE, Zadoo VP, Adrian EK, Yuan CH, Aydelotte J, Garza J.R. 1998. Variability of the midfacial muscles: analysis of 50 hemifacial cadaver dissections. Plast Reconstr Surg. 1998; 102: 1888-93.
- Piccinin MA, Zito PM. *Anatomy, Head and Neck, Lips*. 2022 Jun 11. In: Stat Pearls [Internet]. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing; 2022 Jan. PMID: 29939677.
- 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.
- Rath EM, Essick GK. Perioral somesthetic sensibility: do the skin of the lower face and the midface exhibit comparable sensitivity? J Oral Maxillofac Surg. 1990; 48: 1181-90.
- Sabbah A. Smile Analysis: Diagnosis and Treatment Planning. Dent Clin North Am. 2022; 66: 307-41.
- Savani RC, Cao G, Pooler PM, Zaman A, Zhou Z, DeLisser HM. Differential involvement of the hyaluronan. (HA). receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. J Biol Chem. 2001; 276:36770-8.
- Schötz S, Frid J, Löfqvist A.. Development of speech motor control: lip movement variability. J Acoust Soc Am. 2013; 133: 4210-7.
- Schulze C, Spaethe A, Halata Z. The sensory innervation of the gingiva and mucosa in *Monodelphis domestica*: an ultrastructural study. Acta Anat (Basel). 1993;146:36-41.
- Seto H. Studies on the sensory innervation (Human sensibility). Igoku Shoin Ltd, Tokyo, 1963.

- 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.
- Simon A, Shenton F, Hunter I, Banks RW, Bewick GS. Amiloride-sensitive channels are a major contributor to mechanotransduction in mammalian muscle spindles, *J Physiol.* 2010; 588: 171-85.
- 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.
- Stanley K, Caligiuri M, Schlichting LH, Bazos PK, Magne M. Lip Lifting: Unveiling Dental Beauty. *Int J Esthet Dent.* 2017; 12: 108-14.
- Tachibana T, Fujiwara N, Nawa T. Intraperineural localization of lamellated sensory corpuscles in the skin and oral mucosae of the adult cat and miniature pig. *J Neurocytol.* 1989; 18:61-9.
- Tachibana T, Ishizeki K, Sakakura Y. Distinct types of encapsulated sensory corpuscles in the oral mucosa of the dog: immunohistochemical and electron microscopic studies. *Anat Rec.* 1987a; 217:90-8.
- Tachibana T, Sakakura Y, Ishizeki K, Nawa T. Nerve endings in the vermilion border and mucosal areas of the rat lip. *Arch Histol Jpn.* 1987b; 50:73-85.
- Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4: 528-39.
- Trulsson M, Essick GK. Sensations evoked by microstimulation of single mechanoreceptive afferents innervating the human face and mouth. *J Neurophysiol.* 2010; 103:1741-7.
- Trulsson M, Johansson RS. Orofacial mechanoreceptors in humans: encoding characteristics and responses during natural orofacial behaviors. *Behav Brain Res.* 2002; 135: 27-33.
- van der Bilt A. Assessment of mastication with implications for oral rehabilitation: a review. *J. Oral Rehabil.* 2011; 38: 754-80.
- Vigetti D, Karousou E, Viola M, Deleonibus S, De Luca G, Passi A. Hyaluronan: biosynthesis and signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840: 2452-9.
- von Arx T, Nakashima MJ, Lozanoff S. The Face – A Musculoskeletal Perspective. A literature review. *Swiss Dent J.* 2018; 128: 678-88.
- Watanabe IS. Ultrastructures of mechanoreceptors in the oral mucosa. *Anat Sci Int.* 2004; 79:55-61.
- Watanabe IS, Dias FJ, Mardegan Issa JP, dos Santos Haemmerle CA, Cury DP, Takada SH, Sosthenes MC, Pereira da Silva MC, Campos LM, Nogueira MI, Iyomasa MM.

- Immunohistochemistry and ultrastructural characteristics of nerve endings in the oral mucosa of rat. *Microscopy (Oxf)*. 2013; 62:259-70.
- Weng X, Maxwell-Warburton S, Hasib A, Ma L, Kang L. The membrane receptor CD44: novel insights into metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2022; 33 :318-32.
- 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.
- Won S Y, Yang H M, Woo H S, Chang K Y, Youn K H, Kim H J, Hu K S: Neuroanastomosis and the innervation territory of the mental nerve. *Clin Anat*. 2014; 27: 598-602.
- Woo SH, Lukacs V, de Nooij JC, Zaytseva D, Criddle CR, Francisco A, Jessell TM, Wilkinson KA, Patapoutian A. Piezo2 is the principal mechanotransduction channel for proprioception. *Nat Neurosci*. 2015; 18: 1756-62.
- Wu SQ, Pan BL, An Y, An JX, Chen LJ, Li D. Lip Morphology and Aesthetics: Study Review and Prospects in Plastic Surgery. *Aesthetic Plast Surg*. 2019; 43: 637-43.
- Yamamoto T, Sakada S. Distribution of sensory nerve endings in the labial mucosa of the mouse. *Tohoku J Exp Med*. 1981; 135:345-7.
- Yamamoto T, Tazaki M, Sakada S. Morphological study of the sensory innervation of the rat labial mucosa. *Tohoku J Exp Med*. 1986;148: 229-38.
- Zimmerman A, Bai L, Ginty DD. The gentle touch receptors of mammalian skin. *Science*. 2014; 346:950-4.

Anexo 1.

Curriculum Vitae

Anexo 1 – Curriculum vitae

c v n CURRÍCULUM VITAE NORMALIZADO



José Martín Martín

Generado desde: Editor CVN de FECYT

Fecha del documento: 23/02/2022

v 1.4.3

21a07a32b93ea253a2858ddff889cd83

Este fichero electrónico (PDF) contiene incrustada la tecnología CVN (CVN-XML). La tecnología CVN de este fichero permite exportar e importar los datos curriculares desde y hacia cualquier base de datos compatible. Listado de Bases de Datos adaptadas disponible en <http://cvn.fecyt.es/>





José Martín Martín

Apellidos: **Martín Martín**
Nombre: **José**
DNI: **45952282F**
ORCID: **0000-0002-4496-6582**
Fecha de nacimiento: **05/01/1994**
Sexo: **Hombre**
Nacionalidad: **España**
País de nacimiento: **España**
C. Autón./Reg. de nacimiento: **Galicia**
Provincia de contacto: **La Coruña**
Ciudad de nacimiento: **Noia**
Dirección de contacto: **Rúa fanequeira n°7**
Código postal: **15200**
País de contacto: **España**
C. Autón./Reg. de contacto: **Galicia**
Ciudad de contacto: **Noia**
Teléfono fijo: **981824347**
Correo electrónico: **pepe3214@gmail.com**
Teléfono móvil: **618516748**

Situación profesional actual

Entidad empleadora: Policlínica dental B Martín Biedma
Categoría profesional: Dentista
Fecha de inicio: 15/07/2017
Régimen de dedicación: Tiempo completo



C

V

n

CURRÍCULUM VITAE NORMALIZADO

21a07a32b93ea253a2858ddff889cd83

Formación académica recibida

Titulación universitaria

Estudios de 1º y 2º ciclo, y antiguos ciclos (Licenciados, Diplomados, Ingenieros Superiores, Ingenieros Técnicos, Arquitectos)

1 Titulación universitaria: Titulado Superior

Nombre del título: Máster odontología restauradora y estética

Entidad de titulación: Universitat Internacional de Catalunya **Tipo de entidad:** Universidad

Fecha de titulación: 18/07/2019

2 Nombre del título: Graduado o Graduada en Odontología

Entidad de titulación: Universitat Internacional de Catalunya **Tipo de entidad:** Universidad

Fecha de titulación: 18/07/2017

Conocimiento de Idiomas

Idioma	Comprensión auditiva	Comprensión de lectura	Interacción oral	Expresión oral	Expresión escrita
Gallego	C1	C1	C1	C1	C1

Actividades científicas y tecnológicas

Producción científica

Publicaciones, documentos científicos y técnicos

- 1** Pablo Castelo Baz; Francisco Rodríguez Lozano; María Ginzo Villamayor; Ramón Miguéns Vila; Juan Seoane Romero; José Martín Cruces; Benjamín Martín Biedma. Efficacy of continuous apical negative ultrasonic irrigation (CANUI) in penetration of simulated lateral canals in extracted teeth. Scientific Reports. Medip Academy, 15/03/2021.

Tipo de producción: Artículo científico

Tipo de soporte: Revista

Autor de correspondencia: No

- 2** Juan Suárez Quintanilla; José Martín Cruces; Benjamín Martín Biedma; José Luis Cobo; Antonio José Mérida García; Juan Carlos de Vicente; Luis Manuel Junquera; José Ramón Mérida Velasco; José Antonio Vega. The juxta-oral organ of Chievitz (organum yuxtaorale) updated: Embryology, anatomy, function and pathology. Annals of Anatomy. 232, pp. 1 - 0. Elsevier, 02/11/2020.

Tipo de producción: Artículo científico

Tipo de soporte: Revista

Autor de correspondencia: No



- 3** Ramón Cobbo; Yolanda García Mesa; Lucía Cárcaba; José Martín Cruces; Jorge Feito; Olivia García Suárez; Juan Cobo; Jorge García Piqueras; José Antonio Vega. Verification and characterisation of human digital Ruffini's sensory corpuscles. *Journal of Anatomy*. 0, pp. 1 - 7. Wiley, 05/08/2020.
Tipo de producción: Artículo científico **Tipo de soporte:** Revista
Autor de correspondencia: No
- 4** José Antonio Vega; Yolanda García Mesa; Lucía Cárcaba; César Coronado; Ramón Cobo; José Martín Cruces; Jorge García Piqueras; Jorge Feito; Olivia García Suárez. Glans clitoridis innervation: PIEZO2 and sexual mechanosensitivity. *Journal of Anatomy*. 0 - 1, pp. 1 - 9. Wiley, 12/05/2020.
Tipo de producción: Artículo científico **Tipo de soporte:** Revista
Autor de correspondencia: No
- 5** Juan Luis Cobo; Sonsoles Junquera; José Martín Cruces; Antonio Solé Magdalena; Olivia García Suárez; Teresa Cobo. Proprioceptors in cephalic muscles. *Propioception*. IntechOpen, 24/02/2021.
Tipo de producción: Capítulo de libro **Tipo de soporte:** Libro
Autor de correspondencia: No
- 6** Ramón Cobo; Yolanda García Mesa; Jorge García Piqueras; Jorge Feito; José Martín Cruces; Olivia García Suárez; José Antonio Vega. The Glial Cell of Human Cutaneous Sensory Corpuscles: Origin, Characterization, and Putative Roles. *Somatosensory and Motor Research*. 1, pp. 1 - 15. IntechOpen, 01/07/2020.
Tipo de producción: Capítulo de libro **Tipo de soporte:** Libro
Autor de correspondencia: No
- 7** Benjamín Martín; Giuseppe Cantatore; Beatriz Suárez Mallo; Manuel Ruíz; Pablo Castelo; Walter Dias; Rosa Vilariño; Sandra García Varela; Purificación Varela Patiño; José Martín Cruces. Protocolos clínicos de endodoncia y reconstrucción del diente endodonciado "de la sala de fantasmas a tu clínica". *Protocolos clínicos de endodoncia y reconstrucción del diente endodonciado "de la sala de fantasmas a tu clínica"*. 11, pp. 97 - 103. Atlantis, 02/01/2017.
Tipo de producción: Capítulo de libro **Tipo de soporte:** Libro
- 8** Pablo Castelo Baz; Alba Bello Castro; Alejandro Lorenzo Pouso; Ana Belén Dablanca Blanco; Benjamín Martín Biedma; Fátima Otero Otero; Francesc Abella Sans; Francisco Javier Rodríguez Lozano; Hugo Riveiro Rodríguez; Iván Varela Aneiros; José Bahillo Varela; José Martín Cruces; Juan Seoane Romero; Lucía Fernández Esteván; Manuel Ruíz Piñón; María Freire Álvarez; Mercedes Pérez Herebbia; Miriam Pérez Soba; Pablo Álvarez Novoa; Patricia Rodríguez Roca; Purificación Varela Patiño; Ramón Miguéns Vila; Santiago Mareque Bueno; Selenia Quijada López; Yago Leira Feijo. Aislamiento del campo operatorio. *Aislamiento del campo operatorio*. 15/07/2019.
Tipo de producción: Libro de divulgación **Tipo de soporte:** Libro

Trabajos presentados en congresos nacionales o internacionales

- 1** **Título del trabajo:** Reconstrucción indirecta del diente endodonciado
Nombre del congreso: Curso Clínico Festividad Santa Apolonia
Ciudad de celebración: Santiago de Compostela, Galicia, España
Fecha de celebración: 08/02/2020
Fecha de finalización: 08/02/2020
Entidad organizadora: ICOEC
Ciudad entidad organizadora: A Coruña, Galicia, España
José Martín Cruces.



C

V

N

CURRÍCULUM VITAE NORMALIZADO

21a07a32b93ea253a2858ddff889cd83

- 2 Título del trabajo:** Manejo de tinciones en el sector anterior
Nombre del congreso: SEPES reunión anual
Ciudad de celebración: Valladolid, Castilla y León, España
Fecha de celebración: 11/10/2018
Fecha de finalización: 13/10/2018
Entidad organizadora: SEPES
Ciudad entidad organizadora: Madrid, Galicia, España
José Martín Cruces.
- 3 Título del trabajo:** Conservación de Dientes en Estado Crítico Mediante Avances en la Odontología Restauradora
Nombre del congreso: XXII congreso nacional y IX internacional SEOC
Ciudad de celebración: Sevilla, Andalucía, España
Fecha de celebración: 17/05/2018
Fecha de finalización: 19/05/2018
Entidad organizadora: SEOC
Ciudad entidad organizadora: Madrid, Comunidad de Madrid, España
José Martín Cruces.
- 4 Título del trabajo:** El reimplante intencional ¿Es una opción terapéutica viable?
Nombre del congreso: I Congreso de actualización en odontología
Ciudad de celebración: Noia, Galicia, España
Fecha de celebración: 07/07/2016
Fecha de finalización: 09/07/2016
Entidad organizadora: Consello galego de odontólogos e estomatólogos
Ciudad entidad organizadora: Coruña, Galicia, España
Jesús Pinó Mínguez; Saleta Aboy; Fran Abella Sans; José Martín Cruces; Pablo Castelo Baz; Manuel Ruíz Piñón.
- 5 Título del trabajo:** Resolución de casos complejos
Nombre del congreso: Curso multidisciplinar
Ciudad de celebración: Santiago de Compostela, Galicia, España
Fecha de celebración: 22/01/2016
Fecha de finalización: 23/01/2016
Entidad organizadora: Universidad de Santiago de Compostela **Tipo de entidad:** Universidad
Ciudad entidad organizadora: Santiago de Compostela, Galicia, España
- 6 Título del trabajo:** Protocolos para el blanqueamiento no vital
Nombre del congreso: XI Jornada de blanqueamiento dental
Ciudad de celebración: Noia, Galicia, España
Fecha de celebración: 20/06/2014
Fecha de finalización: 21/06/2014
Entidad organizadora: Policlínica B Martín Biedma
Ciudad entidad organizadora: Noia, Galicia, España
José Martín Cruces; Gara Fernandez; Manuela Lopes; Toni Morelló; Sergio Morelló.
- 7 Título del trabajo:** Análisis espectrofotométrico y de microscopía electrónica de barrido en el tratamiento de dientes con blanqueamiento interno y externo o blanqueamiento interno
Nombre del congreso: X Jornada de Blanqueamiento dentário
Ciudad de celebración: Porto, Norte, Portugal



C
V
n

CURRÍCULUM VITAE NORMALIZADO

21a07a32b93ea253a2858ddff889cd83

Fecha de celebración: 09/04/2013

Entidad organizadora: Asociación universitaria Valenciana de blanqueamiento dental

Ciudad entidad organizadora: Valencia, Comunidad Valenciana, España

José Bahillo Varela; José Martín Cruces; Manuela Lopes; Purificación Valera Patiño; Luis Lires; Berta Rivas.

8 Título del trabajo: Uso de perborato de sodio molido para blanqueamiento interno. Caso multidisciplinar

Nombre del congreso: X Jornada de Blanqueamiento dentário

Ciudad de celebración: Porto, Norte, Portugal

Fecha de celebración: 09/04/2013

Entidad organizadora: Asociación universitaria Valenciana de blanqueamiento dental

Ciudad entidad organizadora: Valencia, Comunidad Valenciana, España

Manuel Ruíz Piñon; Benjamín Martín Biedma; Pablo Castelo Baz; José Martín Cruces; José Amengual Lorenzo; Purificación Valera Patiño.

Gestión de I+D+i y participación en comités científicos

Comités científicos, técnicos y/o asesores

1 Título del comité: Comité científico II congreso internacional galimplant

Entidad de afiliación: Galimplant

Tipo de entidad: Entidad Empresarial

Ciudad entidad afiliación: Santiago, Galicia, España

Fecha de inicio-fin: 26/09/2019 - 28/09/2019

2 Título del comité: Comité científico XI Jornada blanqueamiento dental

Entidad de afiliación: Policlínica dental B Martín Biedma

Ciudad entidad afiliación: Noia, Galicia, España

Fecha de inicio-fin: 20/06/2014 - 21/06/2014

Organización de actividades de I+D+i

1 Título de la actividad: II congreso de actualización en odontología

Tipo de actividad: Congreso

Ámbito geográfico: Nacional

Entidad convocante: Consello galego de odontólogos e estomatólogos

Ciudad entidad convocante: Noia, Galicia, España

Fecha de inicio-fin: 05/07/2018 - 07/07/2018

Duración: 3 días

2 Título de la actividad: Puesta al día en endodoncia rotatoria y opciones para la reconstrucción del diente endodonciado

Tipo de actividad: Curso

Ámbito geográfico: Nacional

Entidad convocante: Universidad de Santiago de Compostela

Tipo de entidad: Universidad

Ciudad entidad convocante: Santiago de Compostela, Galicia, España

Fecha de inicio-fin: 14/11/2014 - 15/11/2014

Duración: 2 días

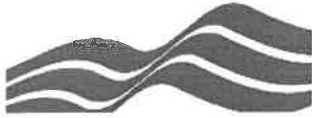
3 Título de la actividad: XI Jornada blanqueamiento dental

Tipo de actividad: Jornada

Ámbito geográfico: Nacional

Entidad convocante: Policlínica B Martín Biedma

Ciudad entidad convocante: Noia, Galicia, España



Fecha de inicio-fin: 20/06/2014 - 20/06/2014

Duración: 2 días

- 4 Título de la actividad:** Curso de adhesión y composites posteriores
Tipo de actividad: Curso **Ámbito geográfico:** Nacional
Entidad convocante: Policlínica dental B Martín Biedma
Ciudad entidad convocante: Noia, Galicia, España
Fecha de inicio-fin: 18/10/2013 - 19/10/2013 **Duración:** 2 días

- 5 Título de la actividad:** Estética en el sector anterior
Tipo de actividad: Curso **Ámbito geográfico:** Nacional
Entidad convocante: Universidad de Santiago de Compostela **Tipo de entidad:** Universidad
Ciudad entidad convocante: Santiago de Compostela, Galicia, España
Fecha de inicio: 18/04/2015 **Duración:** 1 día

Otros méritos

Estancias en centros de I+D+i públicos o privados

Entidad de realización: Dentsply DeTrey
Ciudad entidad realización: Konstanz, Freiburg, Alemania
Fecha de inicio-fin: 17/07/2014 - 31/07/2014 **Duración:** 24 días
Objetivos de la estancia: Contratado/a

Anexo 2.

Artículos derivados de la
Tesis Doctoral

Anexo 2 – Artículos derivados de la Tesis Doctoral

1.- Artículo aceptado en *Annals of Anatomy*

Somatosensory innervation of the human lip with special reference to the vermillion

José Martín-Cruces^{1*}, Benjamín Martín-Biedma^{2*}, Yolanda García-Mesa¹, Patricia Cuendias¹, Juan J. Gaité³, Olivia García-Suárez¹, Juan L. Cobo^{1,3}, José A. Vega^{1,4}

¹Departamento de Morfología y Biología Celular – Grupo SINPOs, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

²Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

³Unidad Dental, Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona, Spain

³Servicio de Cirugía Maxilofacial, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

⁴Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Chile, Santiago de Chile, Chile

*These authors contributed equally to this paper

To whom all correspondence should be addressed:

Prof. José A. Vega

javega@uniovi.es

ABSTRACT. Objectives: The lips are a part of the human face with special sensitivity for touch and thermal sensation. This study focuses on lip somatosensory innervation, especially on sensory corpuscles and the presence of the mechano-gated (ASIC2, PIEZO2 and TRPV4) and thermosensing (TRPV1, TRPM2 and TRPV8) ion channels in these structures. **Methods:** Five whole lips (3 upper and 2 lower) were obtained from non-embalmed frozen cadavers, then fixed in 10% formaldehyde and embedded in paraffin. The age range was 60 to 81 years (3 female and 2 male). **Results:** Different morphotypes of sensory corpuscles were found: Ruffini-like in the vicinity of the papillae of hair follicles, capsulated Meissner's and non-capsulated glomerular corpuscles in the vermillion, and sensory corpuscles of difficult morphological filiation in the oral mucosa. The density of sensory corpuscles in the vermillion was higher in the upper lip than in the lower lip: glomerular corpuscles predominate in the central and middle segments of lips whereas Meissner corpuscles were more abundant in the lateral segment. Regularly the axon of the glomerular and Meissner's corpuscles displayed ASIC2 and PIEZO2 immunoreactivity. TRPV1, TRPV4, TRPM2 and TRPV8 were non-detected. **Conclusions:** The current results demonstrate that the sensory corpuscles of the lips, especially the vermillion, are a mixture between those of the digital glabrous skin and the glabrous skin of other anatomical regions. The appearance of PIEZO2 and ASIC2 in their axons suggests that these sensory nerve formations are mechanosensory.

Keywords: lips, lip somatosensory innervation, glabrous skin, sensory corpuscles, PIEZO2, ASIC2

1. Introduction

The lips are a part of the human face essential for facial expression, mastication, speech and phonation, touch and thermal sensation, physical attraction and sexuality. They are two cutaneous-mucous folds that contain muscles, vessels and nerves (Hur et al., 2010; Shim et al., 2008; Piccinin and Zito, 2022). The external surface of the lips consists of hairy skin with abundant sweat and sebaceous glands, the internal surface is lined with a moist mucous membrane, and the edges are covered with a transition epithelial layer called the vermillion (see Boukoulas et al., 2017).

To carry out the functions in which the lips participate they are richly innervated. The labial muscles are supplied by branches of the facial nerve, whereas the somatosensory innervation depends on branches originated from the trigeminal nerve (Alsaad et al., 2003; Hwang et al. 2004, 2007; Hu et al., 2006, 2007a,b). Both the facial skin and labial mucosa are richly innervated (Corniani et al., 2020), but specially the vermillion (Rath and Essick, 1990).

Regarding the microscopic somatosensory innervation of the lips it has been widely investigated in different mammalian species like mouse (Yamamoto et al., 1981), rat (Yamamoto et al., 1986; Tachibana et al., 1987a; Watanabe et al., 2013), cat and miniature pig (Tachibana et al., 1989), dog (Tachibana et al., 1987a), *Monodelphis domestica* (Schulze et al., 1983), or *Cebus apella* monkey (Iyomasa et al., 1978). In all these species different morphotypes of sensory corpuscles were identified in the labial skin, vermillion and labial mucosa (see also Watanabe, 2004). Nevertheless, data in humans are not too abundant. Classical literature was updated 60 years ago by Seto (1963) who reported the occurrence of “complex branched sensory terminations”, “uncapsulated glomerular bodies”, “capsulated glomerular terminations (genital nerve body type I)” and “plexiform sensory terminations”. More recently, Nolano et al. (2013) in samples of biopsied lips observed abundant intraepithelial nerve fibres, pilo-neural complexes of unmyelinated and myelinated fibres, and occasionally Meissner-like corpuscles, Merkel cell-neurite complexes and Ruffini-like corpuscles.

On the other hand, results from studies of microneurography support the occurrence of different categories of low-threshold mechanoreceptive afferents (LTMRs) innervating the lips, including type I and type II slowly adapting (SA) LTMRs and type I rapidly adapting (RA) LTMRs, but not type II RA LTMRs (Trulsson and Johansson, 2002; Bukowska et al., 2010; Trulsson et al., 2010). Structurally they correspond to Merkel cell-neurite complexes, Ruffini's corpuscles and Meissner corpuscles, respectively (Zimmerman et al., 2014; Cobo et al., 2021).

Thus, the present study was designed to investigate the somatosensory innervation of the adult human lips analyzing the kinds of sensory nerve formations, their

immunohistochemical profile (using a battery of antibodies against the different constituents of the sensory corpuscles; see Cobo et al., 2021) and the occurrence within them of several ion channels involved in mechanosensing (PIEZO2, acid-sensing ion channel 2 -ASIC2- and transient receptor potential vanilloid 4 -TRPV4-) and temperature detection (transient receptor potential melastatina 2 and 8 -TRPM2 and TRPM8- or TRPV1) (see Martín-Alguacil et al., 2021). The study was aimed to provide basic information about the somatosensation of the lips for clinicians and surgeons that manipulate lips therapeutical or esthetical purposes (Baudoin et al., 2019; Wu et al., 2019; Sabbah, 2022).

2. Material and Methods

2.1. *Material and tissue processing.* Upper (n = 3) and lower (n = 2) lip were obtained from our laboratory collection (Registro Nacional de Biobancos, Sección colecciones, Ref. C-0001627). The study was approved by the Ethical Committee for Biomedical Research of the Principality of Asturias, Spain (Cod. CEIm, PAst: Proyecto 266/18). The age of the subjects was 66, 60, 72, 75 and 81years (3 female and 2 male). The pieces were originally removed from non-embalmed frozen cadavers, then fixed in 10% formaldehyde and routinely embedded in paraffin. Now of the use lips were preserved in blocks of paraffin and cut into serial sections 10 μm thick. Selected sections were stained with Masson's trichrome to ascertain structural details.

2.2. *Methods. Single immunohistochemistry.* Deparaffinized and rehydrated sections were processed for indirect immunohistochemistry using Leica Bond™ Polymer Refine Detection Kit (Leica Biosystems™, Newcastle, UK) following the manufacturer's instructions. The primary antibodies used are in Table 1. They included specific axonal (neuron specific enolase: NSE), Schwann-related cell (S100 protein: S100P), endoneurial (CD34 antigen) and perineurial (Glucose transporter 1: Glut1) markers. Furthermore, we used antibodies PIEZO2, ASIC2, TRPV4, TRPV1, TRPM2 and TRPM8. Indirect immunohistochemistry included several negative and positive controls as well as internal positive and negative controls.

2.3. *Quantitative analyses.* The lips were divided into three zones: central (between both philtrum ridges on the upper lip, and a central segment of 2 cm on the lower lip), lateral (2 cm medial to the oral commissure), and middle (1 cm between medial and lateral zones). Ten sections of each zone, 10 μm thick, 200 μm apart, processed detection of S100P were used to identify sensory corpuscles. The sections were scanned by an SCN400F scanner (Leica Biosystems), and the scans were computerized using SlidePath Gateway LAN software (Leica Biosystems™). Then, in 5 randomly selected fields of 400 μm^2 each per section that included the vermillion, the number of sensory corpuscles were counted by two independent observers (JM-C and JAV). Values are expressed as the mean of sensory corpuscles by mm^2 . Due to the low number of sampled corpuscles, no statistical analysis was carried out.

3. Results

To systematically study the innervation of human lips, three territories have been established: cutaneous, mucous and the transition between both, that is, the vermillion (Fig. 1).

3.1. **Hairy skin.** The nerve apparatus of the hairs bulb was not studied because the outer sheath and the perifollicular sheath were plucked or very altered as a result of the freezing process and subsequent fixation of the pieces. Therefore, only the innervation of hair papillae and the surrounding dermis associated is described here. Nerve fibres entering the hair papillae were regularly observed, and in the dermis surrounding the papillae nerve profiles as well as distinct types of sensory nerve formations were found (Fig. 2), most identifiable as Ruffini-like corpuscles (Fig. 2b,c,f). In other cases, these were capsulated formations formed by nerve fibre profiles of different calibers surrounded by a wide intracapsular space (Fig. 2b). Apparently, the highest densities of sensory nerve formations associated to the hair papilla were in the central zone of the lips, followed by the lateral zone and the lowest in the middle zone. A quantitative study of the density of sensory nerve formations due to the irregularity with which they occur was not carried out on the labial skin.

3.2. **Vermillion.** In relation to the transitional epithelium of the vermillion two morphotypes of sensitive corpuscles were found: Meissner's corpuscles and glomerular corpuscles (Fig. 3). Meissner's corpuscles were located on the dermal papillae, at varying distances from the epidermis. They were of different sizes and the laminar cells (glia terminal) that form them, were not compact, nor were they arranged as stacks of flattened sheets (classically described as a "coin stack"). In addition, the intensity of the immunoreaction for S100P was not homogeneous, neither between corpuscles nor in the same corpuscle, and was always weaker than that of the nerve fibres that supply them (Fig. 4). The axons did not present the typical appearance among lamellar cells but a glomerular and pointed appearance (Figs. 3 and 4). Characteristically, Meissner's corpuscles were surrounded by a complete or partial layer of CD34-positive cells, considered endoneural (Fig. 5); on the contrary, no peri-capsular immunoreaction of Glut-1, considered as a specific marker of the perineurium (data not shown), was demonstrated.

As for the glomerular corpuscles, with a "wool ball" or "yarn ball" appearance, they were always located below the epidermis and both the marking of the terminal glial cells and the axons presented a pattern of punctate immunolabeling (Figs. 2 and 3). In no case were evidence of positive CD34 capsules framing these corpuscles were found.

The results of the quantitative analysis are summarized in Table 2. As can be show, and as a rule, the density of glomerular corpuscles was higher than that of Meissner's corpuscles in the central and middle segments, but lower in the lateral segment; and the density of corpuscles was higher in the upper lip than in the lower lip.

Another aspect investigated was the presence of ion channels related to mechanosensitivity in the vermillion sensory corpuscles. The presence of PIEZO2 was detected in cells associated with hair follicles (Figs. 6) and located in the *stratum basale*

of the epithelium (Fig. 6c) that by their location can be identified as Merkel cells. In addition, a fine immunolabeling, apparently axon pattern, was observed in some Meissner (Fig. 6b) and glomerular (Fig. 6d) corpuscles. Axons showing immunoreaction for ASIC2 were also found in Meissner corpuscles but not in glomerular corpuscles (Fig. 6e-h).

3.3. Mucosa. In the labial submucosa sensory nerve formations of diverse types were found. Occasionally they resembled glomerular formations, with dotted pattern and immunoreaction for both axon and glial markers (Figs. 7a-b). In other cases, they formed structures of difficult morphology, very irregular (Figs. 7c-d) or rounded (Fig. 7h). Finally, isolated nerve fibres were found in the submucosa of the folds of the labial mucosa (Figs. 7e-g).

It should be noted that in no case immunoreaction was detected in the sensory nerve formations for Glut-1 or for the ion channels TRPV1, TRPV4, TRPM2 and TRPM8 (data not shown).

4. Discussion

The present research was designed to analyze the innervation of human lips, with special reference to vermillion. The work used a battery of antibodies to identify the axon (NSE and NFP) and Schwann and terminal glial cells (S100P) of nerves and sensory nerve formations, respectively. In addition, the distribution of endoneural (CD34 positive) and perineural (Glut-1 positive) cell markers in these structures was studied. As indirect evidence of the possible function of the sensory nerve formations, it was studied whether any of their components, especially axons, expressed any ion channel related to mechanosensation (ASIC2, PIEZO2 and TRPV4) or thermosensation (TRPV1, TRPM2 and TRPM8) (Cobo et al., 2021; Martin-Alguacil et al., 2021).

Recent studies on the microscopic innervation of human lips are almost non-existent, except for the study by Nolano et al. (2013) who found in samples of biopsied lips abundant intraepithelial nerve fibres, pilo-neural complexes of unmyelinated and myelinated fibres, and occasionally Meissner-like corpuscles, Merkel cell-neurite complexes and Ruffini-like corpuscles. Our results partially coincide with those of these authors since we have found Ruffini-type corpuscles associated with the papilla of the hair follicles, Meissner type corpuscles in the vermillion and other sensory formations of difficult morphological filiation in the submucosa of the labial mucosa. But in no case have complex Merkel-neurite cells been found. It is noteworthy that Nolano et al. (2013) do not describe the presence of glomerular corpuscles that in our study are the most abundant. Surely these discrepancies can be explained because we have analyzed whole lips and they are only small biopsy samples.

There is general agreement that the vermillion is the most innervated part of the lips (Rath and Essick, 1990) and our work has focused on it. Cutaneous afferents, and presumably also vermillion ones, can be distinguished based on their sensory terminals, or sensory corpuscles, and functionally classified based on the conduction speed of their action potentials (Rice and Albrecht, 2008; Zimmerman et al., 2014; Cobo et al., 2021,

Martin-Alguacil et al., 2021). We have found Meissner corpuscles and glomerular corpuscles, and in general the formers are more abundant in the outer third of the lips and the latter in the inner two-thirds. As far as we know it is the first time that the sensitive corpuscles are quantified in the vermillion. Meissner's corpuscles were similar but not the same as those of glabrous skin: terminal glia have an irregular arrangement and not in "coin stack" and their typical immunolabeling with S100P always showed a much lower intensity than that of Schwann cells of the fibres that supply them. We cannot say why this is the case, although it is possible that there are differences in the terminal glia of the sensitive corpuscles according to the anatomical region (Suazo et al., 2022). On the other hand, glomerular corpuscles had only previously been described with silver impregnation techniques and had been termed "uncapsulated glomerular bodies" and "capsulated glomerular terminations (genital nerve body type I)" (Seto, 1963). The findings of our study show that they are effectively not capsulated (they lack CD34 or Glu-1 cell envelope) and morphologically resemble those that exist in the clitoris, although in this location they do have a capsule (García-Mesa et al., 2021).

At the level of the labial mucosa, we have also observed some types of sensory nerve formations of difficult morphological filiation and in scarce number. The predominant sensory nerve formation was free nerve fibres of large caliber; Their possible function as mechanoreceptors must be demonstrated.

The types of sensory corpuscles found in our studies at the cutaneous level (Ruffini-like corpuscles in relation to the papillae of the hair follicles), in the vermillion (Meissner's and glomerular corpuscles) and in the labial mucosa (not morphologically affiliated), which could be the morphological support to the results of microneurography studies that collect type II SA LTMRs and type I RA; however our results do not support the registration of type I SA LTMRs (Trulsson and Johansson, 2002; Bukowska et al., 2010; Trulsson et al., 2010). On the other hand, it is not known to which functional category the glomerular corpuscles can be ascribed and, based on the present results that corpuscles are responsible for the type II RA LTMRs. Probably, combinations of LTMRs are responsible for the final mechanosensitivity of the lips.

Mechanotransduction in sensory corpuscles, involves mechano-gated ion channels (Wu et al., 2017; Douguet and Honoré, 2019), which have been detected in both axon and terminal glial cells of human cutaneous sensory corpuscles (García-Mesa et al., 2017, 2021, 2022; Cobo et al., 2020). The axon of both Meissner and glomerular corpuscles in the vermillion, as well as Merkel cells associated to hairs, display PIEZO2 and ASIC2 immunoreactivity like Meissner's corpuscles and glomerular corpuscles in other cutaneous regions (Cabo et al., 2015; García-Mesa et al., 2017, 2021a, 2021b). As far as we know this is the first report of the occurrence of ASIC2 and PIEZO2 in the sensory corpuscles of human lips.

Somatosensory afferents in the lips respond not only to contact with environmental objects, but also to contact between the lips, changes in air pressure generated for speech sounds, and to deformations that accompany lip during chewing and swallowing.

Furthermore, it has been proposed they provide proprioceptive information (Trulsson and Johansson, 2002; Ito and Gomi, 2007). Nevertheless, this is doubted, and further studies are necessary to clarify how and what is the proprioceptive system of the muscles of the lips. On the other hand, it remains to be elucidated whether ion channels related to thermal sensibility are also present in the human lips.

Ethical statement

This study was approved by the Ethical Committee for Biomedical Research of the Principality of Asturias, Spain (Cod. CEIm, PAsT: Proyecto 266/18).

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

Funding

P.C. was supported by a Grant "Severo Ochoa Program" from the Govern of the Principality of Asturias (PA-21-PF-BP20-122).

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Author contributions

JM-P, YG-M, and PC performed the experiments. BM-B and OG-S collected the material in compliance with ethical guidelines and performed part of the experiments. JLC and OG-S conducted the quantitative analysis. JM-C and JAV designed the study, analyzed the data, and wrote the manuscript.

References

- Alsaad, K., Lee, T. C., McCartan, B. 2003. An anatomical study of the cutaneous branches of the mental nerve. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 32, 325-33.
- Baudoin, J., Meuli, J.N., di Summa, P.G., Watfa, W., Raffoul, W. 2019. A comprehensive guide to upper lip aesthetic rejuvenation. *J Cosmet Dermatol.* 18, 444-50.
- Boukoulas, S., Boson, A.L., Hays, J.P., Malone, C.H., Cole, E.L., Wagner, R.F. 2017. A Systematic Review of Lower Lip Anatomy, Mechanics of Local Flaps, and Special Considerations for Lower Lip Reconstruction. *J Drugs Dermatol.* 16, 1254-61.
- Bukowska, M., Essick, G.K., Trulsson, M. 2010. Functional properties of low threshold mechanoreceptive afferents in the human labial mucosa. *Exp Brain Res.* 20, 59-64.
- Cabo, R., Alonso, P., Viña, E., Vázquez, G., Gago, A., Feito, J., Pérez-Moltó, F.J., García-Suárez, O., Vega, J.A. 2015. ASIC2 is present in human mechanosensory neurons of the dorsal root ganglia and in mechanoreceptors of the glabrous skin. *Histochem Cell Biol.* 143, 267-76.
- Cobo, R., García-Piqueras, J., Cobo, J., Vega, J.A. 2021. The Human Cutaneous Sensory Corpuscles: An Update. *J Clin Med.* 10, 227.
- Cobo, R., García-Piqueras, J., García-Mesa, Y., Feito, J., García-Suárez, O., Vega, J.A. 2020. Peripheral Mechanobiology of Touch-Studies on Vertebrate Cutaneous Sensory Corpuscles. *Int J Mol Sci.* 21, 6221.
- Corniani, G., Saal, H.P. 2020. Tactile innervation densities across the whole body. *J Neurophysiol.* 124, 1229-40.
- Douguet, D., Honoré, E. 2019. Mammalian Mechano-electrical Transduction: Structure and Function of Force-Gated Ion Channels. *Cell.* 179, 340-54.

- García-Mesa, Y., Cárcaba, L., Coronado, C., Cobo, R., Martín-Cruces, J., García-Piqueras, J., Feito, J., García-Suárez, O., Vega, J.A. 2021. Glans clitoridis innervation: PIEZO2 and sexual mechanosensitivity. *J Anat.* 238, 446-54.
- García-Mesa, Y., García-Piqueras, J., Cobo, R., Martín-Cruces, J., Suazo, I., García-Suárez, O., Feito, J., Vega, J.A. 2021. Sensory innervation of the human male prepuce: Meissner's corpuscles predominate. *J Anat.* 239, 892-902.
- García-Mesa, Y., Feito, J., Cuendias, P., García-Piqueras, J., Germanà, A., García-Suárez, O., Martín-Biedma, B., Vega, J.A. 2022. The acquisition of mechanoreceptive competence by human digital Merkel cells and sensory corpuscles during development: An immunohistochemical study of PIEZO2. *Ann Anat.* 243, 151953.
- García-Mesa, Y., García-Piqueras, J., Cobo, R., Martín-Cruces, J., Suazo, I., García-Suárez, O., Feito, J., Vega, J.A. 2021. Sensory innervation of the human male prepuce: Meissner's corpuscles predominate. *J Anat.* 239, 892-902.
- Holden, A.C.L. 2020. Consumed by prestige: the mouth, consumerism, and the dental profession. *Med Health Care Philos.* 23, 261-8.
- Hu, K.S., Kwak, H.H., Song, C., Kang, H.J., Kim, C., Fontaine, C., Kim, H.J. 2006. Branching patterns of the infraorbital nerve and topography within the infraorbital space. *J Craniofac Surg.* 17, 1111-5.
- Hu, K.S., Kwak, J., Koh, K.S., Abe, S., Fontaine, C., Kim, H.J. 2007a. Topographic distribution area of the infraorbital nerve. *Surg Radiol Anat.* 29, 383-8.
- Hu, K.S., Yun, H.S., Hur, M.S., Kwon, H.J., Abe, S., Kim, H.J. 2007b. Branching patterns and intraosseous course of the mental nerve. *J Oral Maxillofac Surg.* 65, 2288-94.
- Hur MS, Hu KS, Park JT, Youn KH, Kim HJ. 2010. New anatomical insight of the levator labii superioris alaeque nasi and the transverse part of the nasalis. *Surg Radiol Anat.* 32, 753-6.
- Hwang, K., Jin, S., Park, J.H., Chung, I.H. 2007. Cutaneous distribution of zygomaticofacial nerve. *J Craniofac Surg.* 18, 575-7.
- Hwang, K., Suh, M.S., Chung, I.H. 2004. Cutaneous distribution of infraorbital nerve. *J Craniofac Surg.* 15, 3-5.
- Ito, T., Gomi, H. 2007. Cutaneous mechanoreceptors contribute to the generation of a cortical reflex in speech. *Neuroreport.* 18, 907-10.
- Iyomasa, M.M., König, B. Jr., Watanabe, I.S. 1978. About the existence and endings of nerve fibres in the *Cebus apella* monkey's upper lip. *Rev Bras Pesqui Med Biol.* 11, 209-12.
- Kar, M., Muluk, N.B., Bafaqeeh, S.A., Cingi, C. 2018. Is it possible to define the ideal lips? *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 38, 67-72.
- Martín-Alguacil, N., de Gaspar, I., Schober, J.M., Pfaff, D.W., Vega, J.A. 2021. *Somatosensation*. In: *Neuroscience in the 21st Century*. Pfaff D.W., Volkow N.D., Rubenstein J. (eds). Springer, New York, NY.
- Nolano, M., Provitera, V., Caporaso, G., Stancanelli, A., Leandri, M., Biasiotta, A., Cruccu, G., Santoro, L., Truini, A. 2013. Cutaneous innervation of the human face as assessed by skin biopsy. *Journal of anatomy.* 222, 161-169.
- Piccinin, M.A., Zito, P.M. 2022. *Anatomy, Head and Neck, Lips*. 2022 Jun 11. In: *Stat Pearls* [Internet]. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing.
- Rath, E.M., Essick, G.K. 1990. Perioral somesthetic sensibility: do the skin of the lower face and the midface exhibit comparable sensitivity? *J Oral Maxillofac Surg.* 48, 1181-90.
- Rice, F.L., Albrecht, P.J. 2008. Cutaneous mechanisms of tactile perception: Morphological and chemical organization of the innervation to the skin, In: *The senses: A comprehensive reference*. Volume 6: Somatostatin (eds Smith D, Firestein S, Beauchamp G). San Diego, USA: Academic.
- Sabbah, A. 2022. Smile Analysis: Diagnosis and Treatment Planning. *Dent Clin North Am.* 66, 307-41.
- Schulze, C., Spaethe, A., Halata, Z. 1993. The sensory innervation of the gingiva and mucosa in *Monodelphis domestica*: an ultrastructural study. *Acta Anat (Basel).* 146, 36-41.

- Seto, H. 1963. Studies on the sensory innervation (Human sensibility). Igoku Shoin Ltd, Tokyo.
- Shim, K.S., Hu, K.S., Kwak, H.H., Youn, K.H., Koh, K.S., Fontaine, C., Kim, H.J. 2008. 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.* 121, 466-73.
- Suazo, I., Vega, J.A., García-Mesa, Y., García-Piqueras, J., García-Suárez, O., Cobo, T. 2022. The Lamellar Cells of Vertebrate Meissner and Pacinian Corpuscles: Development, Characterization, and Functions. *Front Neurosci.* 16, 790130.
- Tachibana, T., Fujiwara, N., Nawa, T. 1989. Intraperineural localization of lamellated sensory corpuscles in the skin and oral mucosae of the adult cat and miniature pig. *J Neurocytol.* 18, 61-9.
- Tachibana, T., Ishizeki, K., Sakakura, Y. 1987a. Distinct types of encapsulated sensory corpuscles in the oral mucosa of the dog: immunohistochemical and electron microscopic studies. *Anat Rec.* 217, 90-8.
- Tachibana, T., Sakakura, Y., Ishizeki, K., Nawa, T. 1987b. Nerve endings in the vermilion border and mucosal areas of the rat lip. *Arch Histol Jpn.* 50, 73-85.
- Trulsson, M., Essick, G.K. 2010. Sensations evoked by microstimulation of single mechanoreceptive afferents innervating the human face and mouth. *J Neurophysiol.* 103, 1741-7.
- Trulsson, M., Johansson, R.S. 2002. Orofacial mechanoreceptors in humans: encoding characteristics and responses during natural orofacial behaviors. *Behav Brain Res.* 135, 27-33.
- Watanabe, I.S. 2004. Ultrastructures of mechanoreceptors in the oral mucosa. *Anat Sci Int.* 79, 55-61.
- Watanabe, I.S., Dias, F.J., Mardegan, Issa. J.P., dos Santos, Haemmerle, C.A., Cury, D.P., Takada, S.H., Sosthenes, M.C., Pereira da Silva, M.C., Campos, L.M., Nogueira, M.I., Iyomasa, M.M. 2013. Immunohistochemistry and ultrastructural characteristics of nerve endings in the oral mucosa of rat. *Microscopy (Oxf).* 62, 259-70.
- Wu, J., Lewis, A.H., Grandl, J. 2017. Touch, Tension, and Transduction - The Function and Regulation of Piezo Ion Channels. *Trends Biochem Sci.* 42, 57-71.
- Wu, S.Q., Pan, B.L., An, Y., An, J.X., Chen, L.J., Li, D. 2019. Lip Morphology and Aesthetics: Study Review and Prospects in Plastic Surgery. *Aesthetic Plast Surg.* 43, 637-43.
- Yamamoto, T., Sakada, S. 1981. Distribution of sensory nerve endings in the labial mucosa of the mouse. *Tohoku J Exp Med.* 135, 345-7.
- Yamamoto, T., Tazaki, M., Sakada, S. 1986. Morphological study of the sensory innervation of the rat labial mucosa. *Tohoku J Exp Med.* 148, 229-38.
- Zimmerman, A., Bai, L., Ginty, D.D. 2014. The gentle touch receptors of mammalian skin. *Science.* 346, 950-4.

Table 1. Primary antibodies used in this study.

Antigen	Origin	Dilution	Supplier
ASIC2	Rabbit	1:200	LifeSpan BioSciences ¹
CD34 (clone QB-END/10)	Mouse	Prediluted	Master Diagnostica ²
Glut1	Rabbit	0.5 µg/ml	Cell Marque ³
NSE (clone BBS/NC/VI-H14)	Mouse	1:1000	Dako ⁴
NFP (clone 2F11)	Mouse	1:100	Dako ⁴
PIEZO2	Rabbit	1:200	Sigma-Aldrich ⁵
S100 protein (clone 4C4.9)	Mouse	1:1000	ThermoFisher Scientific ⁶
S100 protein	Rabbit	1:1000	Dako ⁴
TRPM2	Rabbit	1:100	ThermoFisher Scientific ⁶
TRPM8	Rabbit	1:200	Sigma-Aldrich ⁵
TRPV1	Rabbit	1:200	Sigma-Aldrich ⁵
TRPV4	Rabbit	1:200	LifeSpan BioSciences ¹

Glut1: glucose transporter 1, NSE: neuron specific enolase, NFP: neurofilament protein

¹Seattle, WA; ²Granada, Spain; ³Seattle, WA, USA; ⁴Glostrup, Denmark; ⁵Saint Louis, MS, USA; ⁶Freemont, CA, USA.

Table 2. Density of sensory corpuscles in the human lips/mm². MC: Meissner corpuscles; GC: glomerular corpuscles

		Central zone	Middel zone	Lateral zone
Upper lip	MC	4,35 ± 0,91	3,96 ± 1,02	4,12 ± 0,85
	GC	5,00 ± 1,32	5,34 ± 1,02	3,84 ± 0,95
Lower lip	MC	3,82 ± 0,86	3,76 ± 0,46	3,91 ± 0,77
		4,26 ± 1,20	4,31 ± 0,93	3,56 ± 0,84

Legends for figures

Figure 1.- Cross section of the central third of a human upper lip (left) where the skin (a), the external segment (b) and internal (c) of the vermilion, and the labial mucosa (D) are indicated enlarged. Masson's trichrome staining.

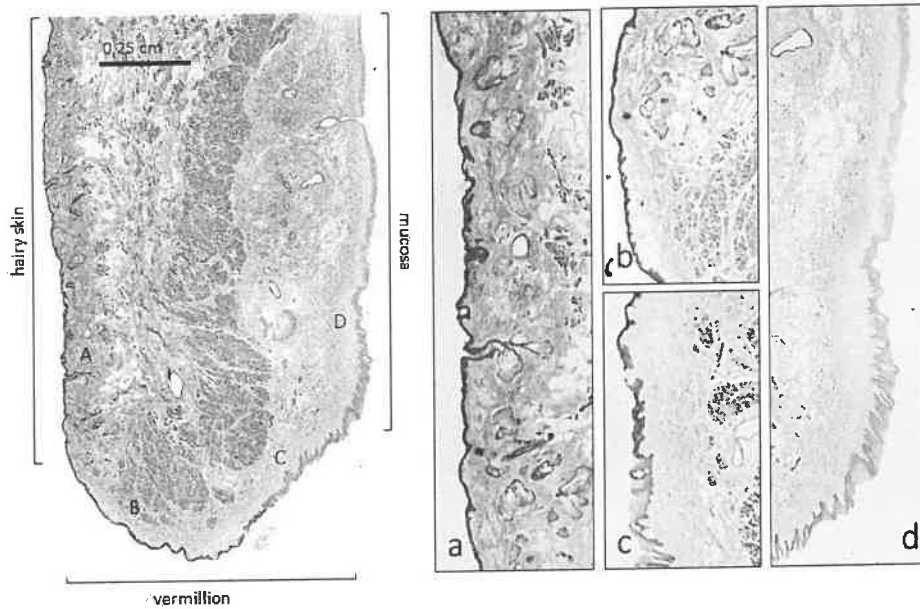


Figure 2.- Innervation of the dermal papilla and peripapillary dermis. Associated with the deep segments of the papilla are isolated nerve fibers (d) and sensory nerve formations with different morphologies (b,c,f, and g) are enlargements of the squares in a and e), many of them identifiable with Ruffini-like corpuscles. UL: upper lip; LL: lower lip.

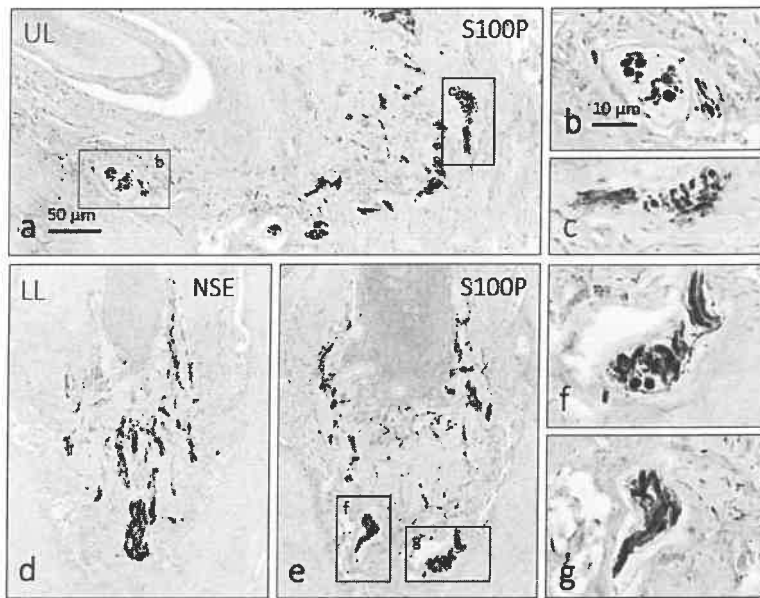


Figure 3.- Main morphotypes of sensory nerve formations in the cutaneous-mucous transcription epithelium of the vermilion. Meissner corpuscles have been observed within the dermal papillae (black arrows) and subepidermal glomerular corpuscles (white arrows). e: epidermis; UL: upper lip; LL: lower lip.

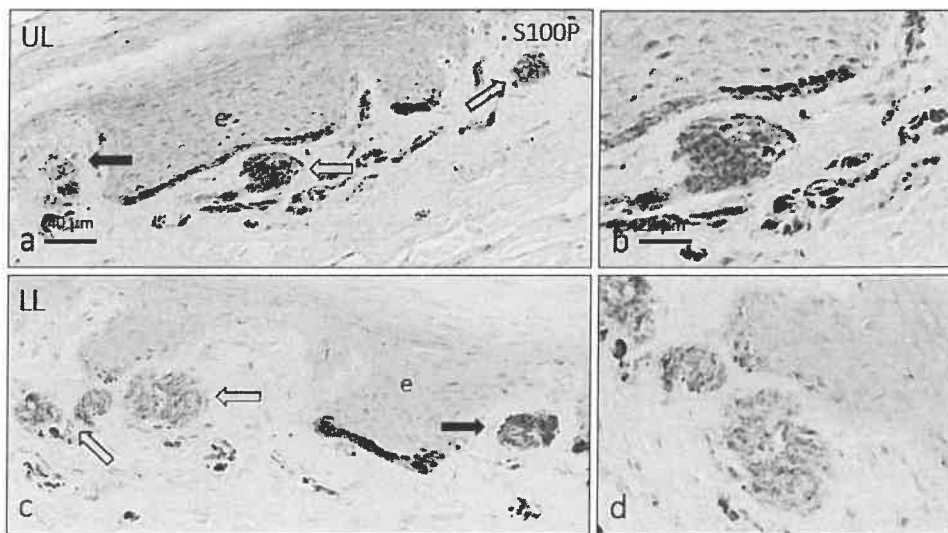


Figure 4.- Different morphotypes of Meissner and glomerular of sensory corpuscles (arrows). The intensity of immunoreaction for the S100 protein was more intense in Schwann cells of the fibers that supply the corpuscle than in corpuscular terminal glial cells (lamellar cells). Immunolabeling for NSE showed a granular pattern of distribution. e: epidermis; UL, upper lip; LL: lower lip.

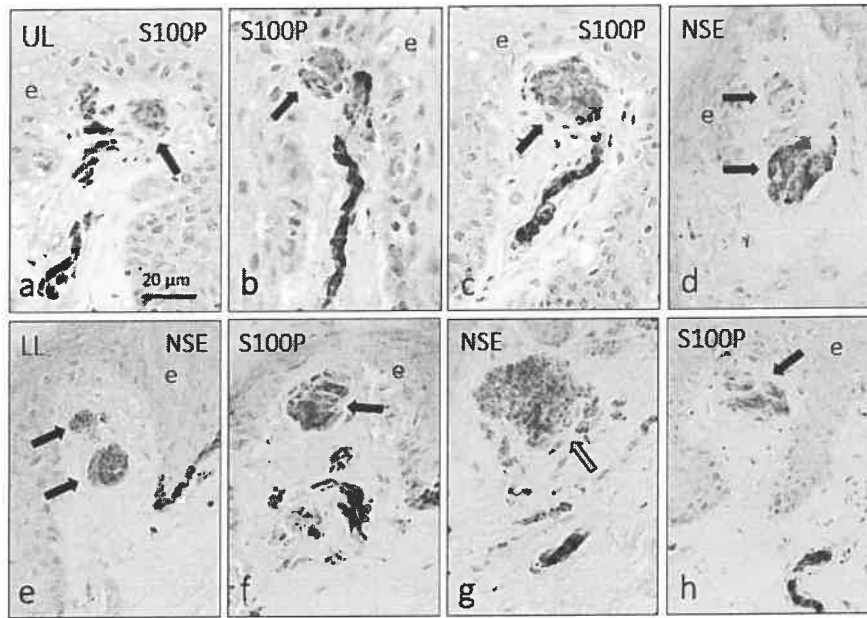


Figure 5.-. Miessner and glomerular sensory corpuscles (arrows) show a complete or incomplete endoneurial capsule of CD-34 positive cells. No e: epidermis; UL: upper lip; LL: lower lip.

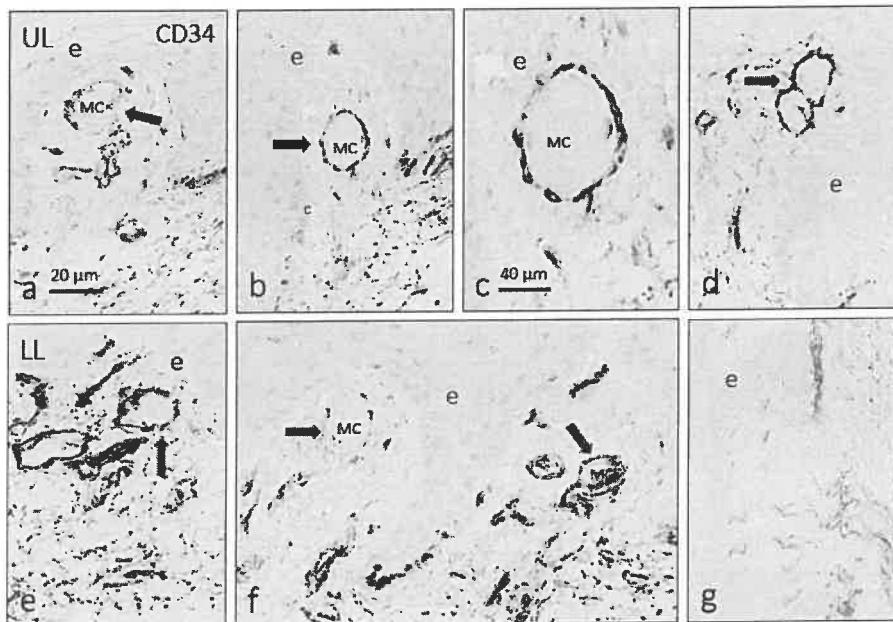


Figure 6.-. Merkel associated to the hair papillae (a) and in the basal layer of the epidermis (c) display immunoreactivity for PIEZO2, as well as some Meissner b) and glomerular (d) corpuscles. Faint ASIC2 immunostaining was restricted to the axons of Meissner corpuscles. e: epidermis.

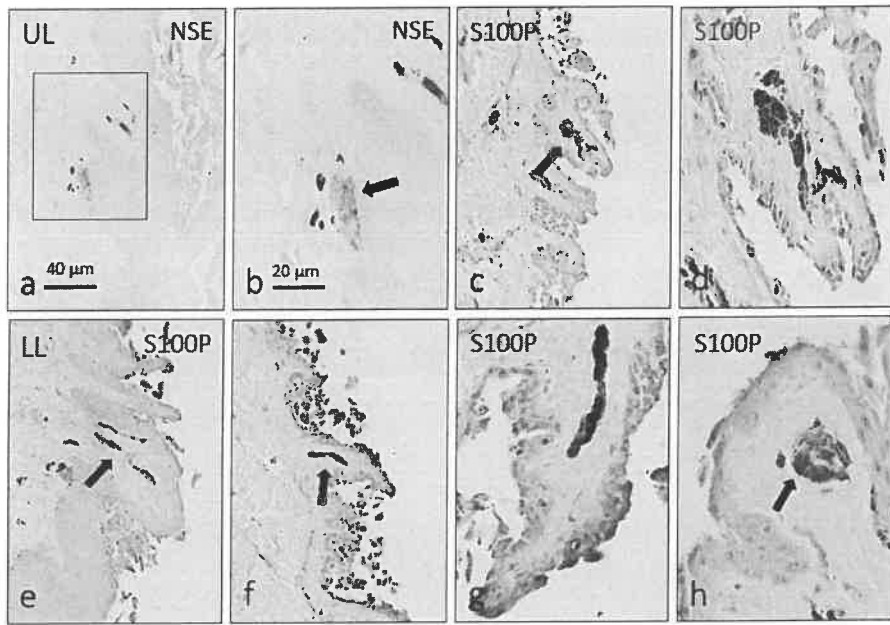
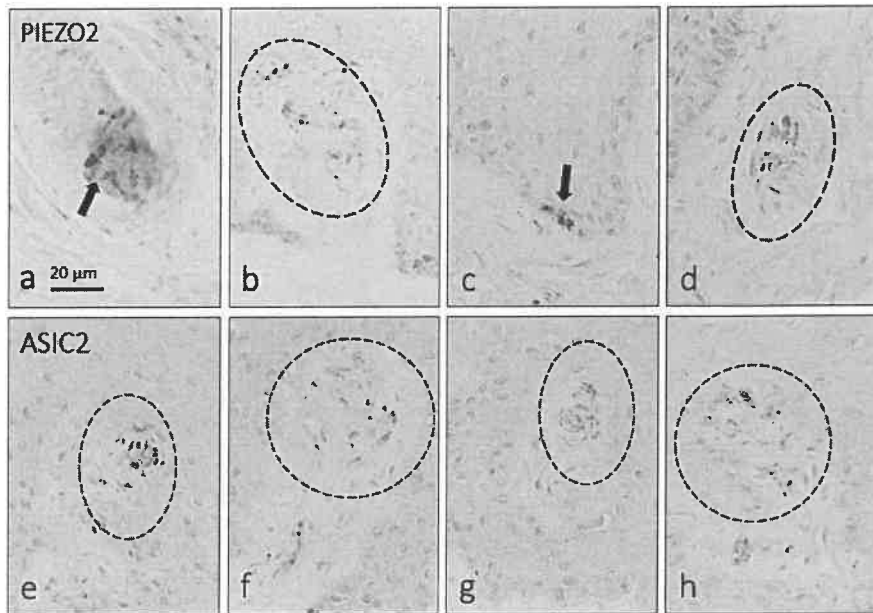


Figure 7.- Immunohistochemical detection of NSE in submucous tissue (a-b), sensory nerve formations difficult to catalogue morphologically (c,d and h) and isolated nerve fibres (e-g.) UL: upper lip; LL: lower lip.



2.- Artículo sometido a *The Anatomical Record*

Proprioceptive innervation of the human lips

José Martín-Cruces¹ (ORCID: 0000-0002-4496-6582), Patricia Cuendias¹ (ORCID: 0000-0002-3199-8200), Yolanda García-Mesa¹ (ORCID: 0000-0003-1442-1095), Juan L. Cobo^{1,2} (ORCID: 0000-0003-2097-4411), Olivia García-Suárez¹ (ORCID: 000-0001-5373-5009), Juan J. Gaité^{1,3} (ORCID:), José A. Vega^{1,4*} (ORCID: 0000-0003-1276-0018), Benjamín Martín-Biedma⁴ (ORCID: 0000-0002-4297-4220).

¹Departamento de Morfología y Biología Celular, Grupo SINPOS, Universidad de Oviedo, Spain.

²Instituto Asturiano de Odontología, Oviedo, Spain.

³Unidad Dental, Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona, Spain.

³Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Chile, Providencia – Santiago de Chile, Chile.

⁴Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas, Universidad de Santiago de Compostela, Spain.

* Corresponding authors

Abstract. The proprioceptive innervation of the facial muscles, including that of the lips, is not completely known. It is classically accepted that facial muscles lack typical proprioceptors, i.e. muscle spindles, but recently this fact has been doubted. However, taking into account the functions and reflexes in which the lips participate, it is clear that they have proprioceptive innervation. In this study, the proprioceptive innervation of human lips has been analyzed using morphological criteria, expression of myosin heavy chain, and presence of mechano-gated ion channel PIEZO2. No muscle spindles were found, but there was a high density of sensory nerve formations, morphologically very heterogeneous, which in some cases resemble Ruffini-like and Pacinian sensory corpuscles. In the axons of these sensory formations the mechanoprotein PIEZO2 is expressed. Taken together, present results demonstrate that human lip muscles lack typical proprioceptors but possess a dense innervation which can serve the lip proprioception.

Keywords: human lips, proprioception, sensory nerve formations, mechano-gated ion channels

Introduction

The lips are one of the most important parts of the face for expression and, nowadays it is one of the most common anatomical regions for surgical and esthetic treatments (DeJoseph et al., 2018; Kar et al., 2018; Holden, 2020; Boson et al., 2021). They receive somatosensory innervation throughout branches of the infraorbital nerve (upper lip; Hwang et al. 2004, 2007) and of the mental nerve (lower lip; Alsaad et al., 2003; Hu et al., 2006, 2007a,b) of the trigeminal nerve. Furthermore, the facial nerve throughout the buccal branch provides motor innervation to the *orbicularis oris*, elevator muscles of the

lip and lip angle muscles, whereas the marginal mandibular branch supplies most muscles responsible for depression of the lip (Hwang et al., 2006; Cattaneo and Pavesi, 2014).

In addition to somatosensory and motor innervation, the lips have proprioceptive innervation responsible for maintenance of the muscular tone (Neilson et al., 1979). The proprioceptive innervation of the facial muscles, including the labial ones, is not completely understood, but it is accepted that they received proprioceptive nerve fibres from the trigeminal throughout trigeminal-facial nerve connections (Lazarov, 2007; Won et al., 2014; Cobo et al., 2017b). However, the facial muscles lack typical proprioceptors, i.e. muscle spindles (Cattaneo and Pavesi, 2014), which are replaced by other sensory nerve formations with proprioceptive properties (see Cobo et al., 2017a; 2019). The proprioception plays a key role in facial expression and coordination, regulation of masticatory force and oromotor behavior, non-verbal facial communication, as well as in orofacial reflexes related to speech, swallowing, cough, vomit or breathing (Wild et al., 2003; Kang et al., 2005; van der Bilt, 2011; Hontanilla and Marre, 2013; Schötz et al., 2013; Cattaneo and Pavesi, 2014; Frayne et al., 2016).

To perform a precise, accurate and successful interventions on the lips it is mandatory to understand the anatomy and physiology of this anatomical region. Thus, the present study was designed to investigate the proprioceptive innervation of the adult human lips by identifying morphologically differentiate proprioceptors detecting, and the de detection within them of PIEZO2, a mechanogated ion channel regarded to be involved in proprioception (Woo et al., 2015; Nagel and Chesler, 2022). The study was aimed to provide a detailed analysis of the human lips proprioceptive innervation that may serve for all medical and odontology specialties that manipulate lips for aesthetic purposes.

2. Material and Methods

2.1. Material and tissue processing. Sections of three upper and two lower lips from five non-embalmed frozen cadavers were obtained from our laboratory collection (Registro Nacional de Biobancos, Sección colecciones, Ref. C-0001627, responsible O. G-S). The age of the subjects was 66, 60, 72, 75 and 81 years. These materials were routinely embedded in paraffin and cut into serial sections 10 µm thick. Selected sections were stained with Masson's trichrome to ascertain structural details. The study was approved by the Ethical Committee for Biomedical Research of the Principality of Asturias, Spain (Cod. CEIm, PAs: Proyecto 266/18). Furthermore, the lips were divided into three zones: medial (between both philtral ridges in the upper lip, and a central segment of 2 cm in the lower lip), lateral (2 cm medial to the oral commissure) and medium (between the previous two).

2.2. Methods. Deparaffinized and rehydrated sections were processed for indirect immunohistochemistry using Leica Bond™ Polymer Refine Detection Kit (Leica Biosystems™, Newcastle, UK) following the manufacturer's instructions. The primary antibodies used were to selectively label axonal (neurofilament proteins: NFP), Schwann cells (S100 protein: S100P), endoneurial (CD34) and perineurial (Glut1) cells, PIEZO2, and

myosin heavy chain (see Table 1). Indirect immunohistochemistry included several negative and positive controls as well as internal positive and negative controls. Furthermore, in deparaffinised and rehydrated sections double immunofluorescence was carried out, to simultaneously detect S100P and CD34. Briefly, non-specific binding was reduced (incubation for 30 minutes with a solution of 5% bovine serum albumin in Tris-buffered saline (TBS), pH 7.4). Sections were then incubated overnight at 4°C in a humid chamber with a 1:1 (v/v) mixture of anti-S100P and anti-CD34. After rinsing, sections were incubated for 1 hour with Alexa Fluor 488-conjugated goat antirabbit IgG (Serotec™, Oxford, UK, diluted 1:1000), rinsed again, and incubated for another hour with a Cy3-conjugated donkey anti-mouse antibody (Jackson-ImmunoResearch™, Baltimore, MD, USA, diluted 1:50). Both steps were performed at 20° C room temperature in a dark, humid chamber. Thereafter, sections were washed and mounted with Fluoromount Gold (ThermoFisher, Runcoen, UK), and finally, sections were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; 10 ng/ml) to label nuclei. Triple staining was detected using a Leica DMR-XA automatic fluorescence microscope coupled with Leica Confocal Software, version 2.5 (Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Germany), and captured images were processed using the software ImageJ, version 1.43 g at the Master Biophotonics Facility, McMaster University, Ontario, Canada (www.macbiophotonics.ca). As controls, representative sections were processed in the same way as described above, using non-immune rabbit or mouse sera instead of primary antibodies or while omitting primary antibodies during incubation.

3. Results

The muscles of the human lips are disposed forming two planes, superficial and a deep, separated by a plane that contains branches of the facial nerve. The depth muscles are the *orbicularis oris* and the *buccinator* muscle, and the superficial ones are: *mentalis risorius*, *zygomaticus major* and *minor*, *levator labii superioris*, *levator labii superioris alaquae nasi*, *depressor anguli oris* and *depressor labii inferiors* and some parts of the *orbicularis oris* (Pessa et al., 1998; Shim et al., 2008; Hur et al., 2010). The description of the results that was made here do not take into account the different muscles but the presence or not of typical proprioceptors, i.e. muscle spindles, and other morphotypes of sensory nerve formations capable of functioning as proprioceptors.

The first stage of the research consisted of locating structures that were morphologically compatible with neuromuscular spindles. Only in two sections of the central and intermediate third of the upper lip, structures resembling neuromuscular spindles were observed (Fig. 1a) based on the caliber and arrangement of the muscle fibers. However, in none of the sections analyzed was immunoreactivity for myosin heave chain, considered specific to intrafusal fibers (Fig. 1b).

By immunodetection of S100P it has been shown that muscles of the human lips have a high density of innervation, located mainly in the perimysium septa and in the connective

tissue that separate the different muscles (Fig 2a). The muscular nervous apparatus of the lips appears as isolated nerve fibers (Fig. 2b) and as capsulated formations containing nerve fibers of different calibers; the latter are especially abundant in the superficial area of the muscle fascicles (Fig. 2c-e).

Sometimes the sensory nerve formations located in the connective septa of the lips can be confused with nerves. However, their appearance is very different since the nerves are formed by groups of nerve fibers of similar calibers, compact and directly surrounded by endoneurium-perineurium layers; In contrast, sensory nerve formations contain a small number of thick nerve fibers and fine nerve fibers, or only one thick fiber and smaller caliber fibers, or several small-caliber fibers. But in all cases these formations have a wide space delimited by a capsule surrounding nerve fibers. Occasionally, sensory nerve formations with the appearance of Ruffini-like and Pacini-like corpuscles were observed (Figs. 2a and 2i). These results were confirmed using double immunofluorescence observing the different caliber of nerve fibers within the sensory nerve formations and the delimitation of space by a more or less complete capsule of CD34 positive endoneurium (the reaction for the perineurial antigen Glut1 was negative; data not shown).

A direct method of highlighting mechanoceptive-proprioceptive formations in skeletal muscles is the demonstration in them of mechanoproteins involved in them, especially PIEZO2. In serial sections processed for the immunohistochemical detection of S100P and PIEZO2 we have detected the presence of PIEZO2 in the axons that supply the sensory nerve formations of the lips (Fig. 3) and in some isolated nerve fibers.

4. Discussion

The lips are muscle-cutaneous-mucous structures that surround the oral cavity and play a key role in mastication, facial expression, phonation, tactile sensation, and intimacy. Furthermore, they participate in orofacial reflexes (see Cattaneo and Pavesi, 2014; Frayne et al., 2016). Furthermore, The muscle tone of the labial muscles depends on the proprioceptive innervation and the presence of the neuromuscular spindles or other sensitive organs capable of replace it. The absence of muscular tone determines the muscular flaccidity and in case of labial muscles changes of facial expression and esthetic alterations.

But human facial muscles, including labial muscles, do not have typical proprioceptors, i.e. neuromuscular spindles, as is the case in most skeletal muscles (Stål et al., 1987, 1990; Kamen and De Luca 1992; Happk et al., 1994). Therefore, a putative facial proprioceptive system, if present, must be represented by other structures not identified yet. Nevertheless, muscle spindles are present muscles innervated by the facial nerve like *platysma colli* (May et al., 2018,2022) *platysma colli* muscle, and recently, Omstead et al. (2023) hypothesized that facial muscles contain muscle spindles, and predicted that humans would have the greatest number, given the role our lips play in speech. We have

repeatedly investigated the occurrence of muscle spindles in human cephalic muscles, and we have never found muscle spindles in facial muscles (see for a revision Cobo et al., 2019, 2021). Thus it was hypothesized that other sensory nerve formations or sensitive elements must function as proprioceptor-like in those muscles.

In the present study we have confirmed, by structural and immunohistochemical techniques, the absence of muscle spindles in human labial muscles. We have not found formations with organization of muscle spindles and immunoreactivity was never detected for myosin heavy chain regarded a specific marker for muscle fibers proper of muscle spindles (Liu et al., 2002). On the contrary, we have observed a rich sensory nerve apparatus distributed in the perimysium and connective septa of the lips, which could function as a proprioceptive-like system. These are nerve fibres of different calibers included in an endoneurial capsule, with a large intracapsular space. Only occasionally do they resembled Ruffini-like and Pacini-like sensory corpuscles. In our opinion these two morphotypes of sensory structures could function as proprioceptors in the lips. It has been proposed that some types of cutaneous mechanoreceptors may also function as proprioceptors, but their physiological properties suggest that they are not the alternative to muscle spindles (see Proske and Gandevia, 2012).

It is actually accepted that at the basis of all sensory modalities there are ion channels and therefore at the basis of mechanosensitivity, including proprioception, are expected mechanically gated ion channels (Bewick and Banks, 2015; Kröger, 2018). At present acid-sensing ion channel 2, transient-receptor potential vanilloid 4 ion channels, and PIEZO2 have been found in muscle spindles and are strong candidates to initiate the mechanotransduction for proprioception (Simon et al., 2010; Chen and Wong, 2013; Woo et al., 2015; Nagel and Chesler, 2022). In the present study we have found that most of the sensory nerve formations identified as possible proprioceptors-like express PIEZO2 in their axons which supports this function. Unfortunately, we have not been able to identify axons by NFP and NSE, presumably due to alterations of them as a result of the technical processing of the parts. However, we believe that these are axons due to the morphology, size and location of immunoreactivity for PIEZO2.

Taken together, the results demonstrate that human lip muscles lack typical proprioceptors but possess a dense sensory nervous apparatus that may function, at least in part, as proprioceptor-likes. Our study is limited by the sample size and technical malfunctions of some of the antibodies used but is consistent with previous studies by our group (Cobo et al., 2017b, 2021). The perioral muscles have a special mimetic function and esthetic function and the perfect knowledge of their anatomy and innervation is essential to perform treatments properly (Hotta, 2016; Hwang, 2020; Morena Serna et al., 2021).

Ethical statement

This study was approved by the Ethical Committee for Biomedical Research of the Principality of Asturias, Spain (Cod. CEIm, PAst: Proyecto 266/18).

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

Acknowledgements

P.C. (PA-21-PF-BP20-122) were supported by Grants "Severo Ochoa Program" from the Govern of the Principality of Asturias and Y.G.M by a contract in charge of the F.U.O.. The authors thank Dr. Marta Guervos (Servicios Comunes de Investigación, Microscopia Confocal, Universidad de Oviedo) and Marta Sánchez-Pitiot (Grupo de Histopatología Molecular, Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias) for technical assistance.

References

- Alsaad, K., Lee, T. C., & McCartan, B. (2003). An anatomical study of the cutaneous branches of the mental nerve. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 32(3), 325–333. <https://doi.org/10.1054/ijom.2002.0334>
- Bewick, G. S., & Banks, R. W. (2015). Mechanotransduction in the muscle spindle. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 467(1), 175–190. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1536-9>
- Boson, A. L., Boukvalas, S., Hays, J. P., Hammel, J. A., Cole, E. L., & Wagner, R. F., Jr (2021). Upper Lip Anatomy, Mechanics of Local Flaps, and Considerations for Reconstruction. *Cutis*, 107(3), 144–148. <https://doi.org/10.12788/cutis.0205>
- Cattaneo, L., & Pavesi, G. (2014). The facial motor system. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 38, 135–159. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.11.002>
- Chen, C. C., & Wong, C. W. (2013). Neurosensory mechanotransduction through acid-sensing ion channels. *Journal of cellular and molecular medicine*, 17(3), 337–349. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12025>
- Cobo JL, Junquera S, Solé-Magdalena A, García-Suarez O & Cobo T. Proprioceptors in cephalic muscles. In: Proprioception. J.A. Vega and J. Cobo Eds. IntechOpen, London, 2021. <http://doi.org/10.5772/intechopen.96794>
- Cobo, J. L., Abbate, F., de Vicente, J. C., Cobo, J., & Vega, J. A. (2017). Searching for proprioceptors in human facial muscles. *Neuroscience letters*, 640, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.01.016>
- Cobo JL, Solé-Magdalena A, Menendez I, De Vicente JC, Vega JA. Connections between the facial and trigeminal nerves: Anatomical basis for facial muscle proprioception. *JPRAS Open*. 2017b; 12:9-18.
- Cobo JL, Solé-Magdalena A, Junquera S, Cobo T, Vega JA & Cobo J. The Proprioception in the Muscles Supplied by the Facial Nerve. In: Selected topics in facial nerve disorders. I. Al-Zawaini and M. Jalal Hussein Eds. InTech, London, 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84463>
- DeJoseph, L. M., Agarwal, A., & Greco, T. M. (2018). Lip Augmentation. *Facial plastic surgery clinics of North America*, 26(2), 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2017.12.005>
- 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. *Experimental brain research*, 234(6), 1679–1687. <https://doi.org/10.1007/s00221-016-4573-0>
- Happak, W., Burggasser, G., Liu, J., Gruber, H., & Freilinger, G. (1994). Anatomy and histology of the mimic muscles and the supplying facial nerve. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, S85–S86. https://doi.org/10.1007/978-3-642-85090-5_23

- Holden A. C. L. (2020). Consumed by prestige: the mouth, consumerism and the dental profession. *Medicine, health care, and philosophy*, 23(2), 261–268. <https://doi.org/10.1007/s11019-019-09924-4>
- Hontanilla, B., & Marre, D. (2013). Retrospective study of the functional recovery of men compared with that of women with long-term facial paralysis. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*, 51(8), 684–688. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2013.04.012>
- Hotta T. A. (2016). Understanding the Perioral Anatomy. *Plastic surgical nursing : official journal of the American Society of Plastic and Reconstructive Surgical Nurses*, 36(1), 12–E1. <https://doi.org/10.1097/PSN.0000000000000126>
- Hu, K. S., Kwak, H. H., Song, W. C., Kang, H. J., Kim, H. C., Fontaine, C., & Kim, H. J. (2006). Branching patterns of the infraorbital nerve and topography within the infraorbital space. *The Journal of craniofacial surgery*, 17(6), 1111–1115. <https://doi.org/10.1097/01.scs.0000236436.97720.5f>
- Hu, K. S., Kwak, J., Koh, K. S., Abe, S., Fontaine, C., & Kim, H. J. (2007). Topographic distribution area of the infraorbital nerve. *Surgical and radiologic anatomy : SRA*, 29(5), 383–388. <https://doi.org/10.1007/s00276-007-0227-z>
- Hu, K. S., Yun, H. S., Hur, M. S., Kwon, H. J., Abe, S., & Kim, H. J. (2007). Branching patterns and intraosseous course of the mental nerve. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 65(11), 2288–2294. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2007.06.658>
- Hur, M. S., Hu, K. S., Park, J. T., Youn, K. H., & Kim, H. J. (2010). New anatomical insight of the levator labii superioris alaeque nasi and the transverse part of the nasalis. *Surgical and radiologic anatomy : SRA*, 32(8), 753–756. <https://doi.org/10.1007/s00276-010-0679-4>
- Hwang K. (2020). Periorbital and Perioral Regions in Relation to Aging. *The Journal of craniofacial surgery*, 31(7), e676–e679. <https://doi.org/10.1097/SCS.00000000000006518>
- Hwang K. (2020). Periorbital and Perioral Regions in Relation to Aging. *The Journal of craniofacial surgery*, 31(7), e676–e679. <https://doi.org/10.1097/SCS.00000000000006518>
- Hwang, K., Jin, S., Hwang, S. H., & Chung, I. H. (2006). Innervation of upper orbicularis oris muscle. *The Journal of craniofacial surgery*, 17(6), 1116–1117. <https://doi.org/10.1097/01.scs.0000235107.70118.06>
- Hwang, K., Jin, S., Park, J. H., & Chung, I. H. (2007). Cutaneous distribution of zygomaticofacial nerve. *The Journal of craniofacial surgery*, 18(3), 575–577. <https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e3180338584>
- Hwang, K., Suh, M. S., & Chung, I. H. (2004). Cutaneous distribution of infraorbital nerve. *The Journal of craniofacial surgery*, 15(1), 3–5. <https://doi.org/10.1097/00001665-200401000-00002>
- Kamen, G., & De Luca, C. J. (1992). Firing rate interactions among human orbicularis oris motor units. *The International journal of neuroscience*, 64(1-4), 167–175. <https://doi.org/10.3109/00207459209000542>
- Kang, Y. S., Bae, Y. C., Hwang, S. M., & Nam, S. B. (2005). A simple and quantitative method for three-dimensional measurement of normal smiles. *Annals of plastic surgery*, 54(4), 379–383. <https://doi.org/10.1097/01.sap.0000154851.42004.a7>
- Kar, M., Muluk, N. B., Bafaqeeh, S. A., & Cingi, C. (2018). Is it possible to define the ideal lips?. *Acta otorhinolaryngologica Italica : organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale*, 38(1), 67–72. <https://doi.org/10.14639/0392-100X-1511>
- Kröger S. (2018). Proprioception 2.0: novel functions for muscle spindles. *Current opinion in neurology*, 31(5), 592–598. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000590>
- Lazarov N. E. (2007). Neurobiology of orofacial proprioception. *Brain research reviews*, 56(2), 362–383. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.08.009>
- Liu, J. X., Eriksson, P. O., Thornell, L. E., & Pedrosa-Domellöf, F. (2002). Myosin heavy chain composition of muscle spindles in human biceps brachii. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 50(2), 171–183. <https://doi.org/10.1177/002215540205000205>

- May, A., Bramké, S., Funk, R. H. W., & May, C. A. (2018). The human platysma contains numerous muscle spindles. *Journal of anatomy*, 232(1), 146–151. <https://doi.org/10.1111/joa.12724>
- May, C. A., Mätz-Rensing, K., Aschoff, D., & Bramke, S. (2022). Muscle spindles in the rhesus monkey platysma. *Journal of anatomy*, 240(5), 936–940. <https://doi.org/10.1111/joa.13604>
- Morera Serna, E., Serna Benbassat, M., Terré Falcón, R., & Murillo Martín, J. (2021). Anatomy and Aging of the Perioral Region. *Facial plastic surgery : FPS*, 37(2), 176–193. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1725104>
- Nagel, M., & Chesler, A. T. (2022). PIEZO2 ion channels in proprioception. *Current opinion in neurobiology*, 75, 102572. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2022.102572>
- Neilson, P. D., Andrews, G., Guitar, B. E., & Quinn, P. T. (1979). Tonic stretch reflexes in lip, tongue and jaw muscles. *Brain research*, 178(2-3), 311–327. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90696-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90696-6)
- Omstead, K. M., Williams, J., Weinberg, S. M., Marazita, M. L., & Burrows, A. M. (2023). Mammalian facial muscles contain muscle spindles. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 10.1002/ar.25172. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/ar.25172>
- Pessa, J. E., Zadoo, V. P., Adrian, E. K., Jr, Yuan, C. H., Aydelotte, J., & Garza, J. R. (1998). Variability of the midfacial muscles: analysis of 50 hemifacial cadaver dissections. *Plastic and reconstructive surgery*, 102(6), 1888–1893. <https://doi.org/10.1097/00006534-199811000-00013>
- Proske, U., & Gandevia, S. C. (2012). The proprioceptive senses: their roles in signaling body shape, body position and movement, and muscle force. *Physiological reviews*, 92(4), 1651–1697. <https://doi.org/10.1152/physrev.00048.2011>
- Schötz, S., Frid, J., & Löfqvist, A. (2013). Development of speech motor control: lip movement variability. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 133(6), 4210–4217. <https://doi.org/10.1121/1.4802649>
- Shim, K. S., Hu, K. S., Kwak, H. H., Youn, K. H., Koh, K. S., Fontaine, C., & Kim, H. J. (2008). An anatomical study of the insertion of the zygomaticus major muscle in humans focused on the muscle arrangement at the corner of the mouth. *Plastic and reconstructive surgery*, 121(2), 466–473. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000297652.29671.1a>
- Simon, A., Shenton, F., Hunter, I., Banks, R. W., & Bewick, G. S. (2010). Amiloride-sensitive channels are a major contributor to mechanotransduction in mammalian muscle spindles. *The Journal of physiology*, 588(Pt 1), 171–185. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.182683>
- Stål, P., Eriksson, P. O., Eriksson, A., & Thornell, L. E. (1987). Enzyme-histochemical differences in fibre-type between the human major and minor zygomatic and the first dorsal interosseus muscles. *Archives of oral biology*, 32(11), 833–841. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(87\)90011-2](https://doi.org/10.1016/0003-9969(87)90011-2)
- Stål, P., Eriksson, P. O., Eriksson, A., & Thornell, L. E. (1990). Enzyme-histochemical and morphological characteristics of muscle fibre types in the human buccinator and orbicularis oris. *Archives of oral biology*, 35(6), 449–458. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(90\)90208-r](https://doi.org/10.1016/0003-9969(90)90208-r)
- van der Bilt A. (2011). Assessment of mastication with implications for oral rehabilitation: a review. *Journal of oral rehabilitation*, 38(10), 754–780. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2010.02197.x>
- Wild, B., Erb, M., Eyb, M., Bartels, M., & Grodd, W. (2003). Why are smiles contagious? An fMRI study of the interaction between perception of facial affect and facial movements. *Psychiatry research*, 123(1), 17–36. [https://doi.org/10.1016/s0925-4927\(03\)00006-4](https://doi.org/10.1016/s0925-4927(03)00006-4)
- Won, S. Y., Yang, H. M., Woo, H. S., Chang, K. Y., Youn, K. H., Kim, H. J., & Hu, K. S. (2014). Neuroanastomosis and the innervation territory of the mental nerve. *Clinical anatomy (New York, N.Y.)*, 27(4), 598–602. <https://doi.org/10.1002/ca.22310>
- Woo, S. H., Lukacs, V., de Nooij, J. C., Zaytseva, D., Criddle, C. R., Francisco, A., Jessell, T. M., Wilkinson, K. A., & Patapoutian, A. (2015). Piezo2 is the principal mechanotransduction channel for proprioception. *Nature neuroscience*, 18(12), 1756–1762. <https://doi.org/10.1038/nn.4162>

Table 1 Primary antibodies used in the study.

Antigen	Origin	Dilution	Supplier
CD34 (clone QB-END/10)	Mouse	Prediluted	Master Diagnostica ¹
Glut1	Rabbit	0.5 µg/ml	Cell Marque ²
NFP (clone 2F11)	Mouse	1:100	Dako ³
MHC	Rabbit	1 :200	ThermoFisher Scientific ⁴
PIEZO2*	Rabbit	1:200	Sigma-Aldrich ⁵
S100 protein (clone 4C4.9)	Mouse	1:1000	ThermoFisher Scientific ⁵
S100 protein	Rabbit	1:1000	Dako ³

Glut1: glucose transporter 1, MHC: myosin heavy chain, NSE: neuron specific enolase, NFP: neurofilament protein

¹Granada, Spain; ²Seattle, WA, USA; ³Glostrup, Denmark; ⁴Freemont, CA, USA; ⁵Saint Louis, MS, USA.

*Amino acid sequence recognized:

FEDENKAAVRIMAGDNVEICMNLDAASFQHNP

Legends for figures

Figure 1.- Hematoxylin & eosin staining (a) and immunohistochemistry for the detection of myosin heavy chain in the *orbicularis oris* muscle of the upper lip. Occasionally structures similar to muscle spindles (arrows in a) were observed but no reaction was detected for the myosin of the muscle fibers of the spindles.

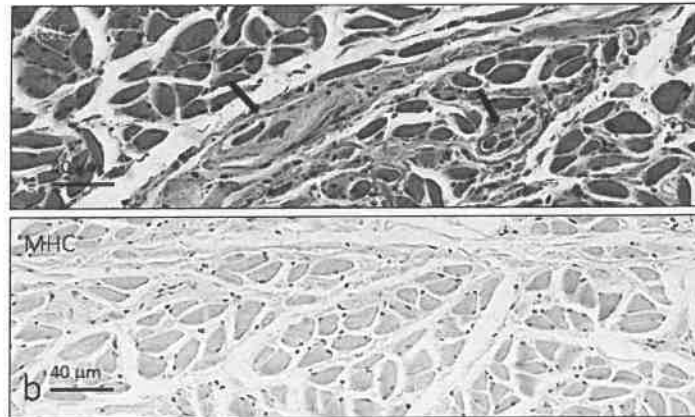


Figure 2.- Immunohistochemistry for the S100 protein. Muscle fasciculus corresponding to the *orbicularis oris* muscle of the lower lip showing the nervous system within it (a). In the septa of perimysium there are sensory nerve formations with different morphologies (arrows in b to e).

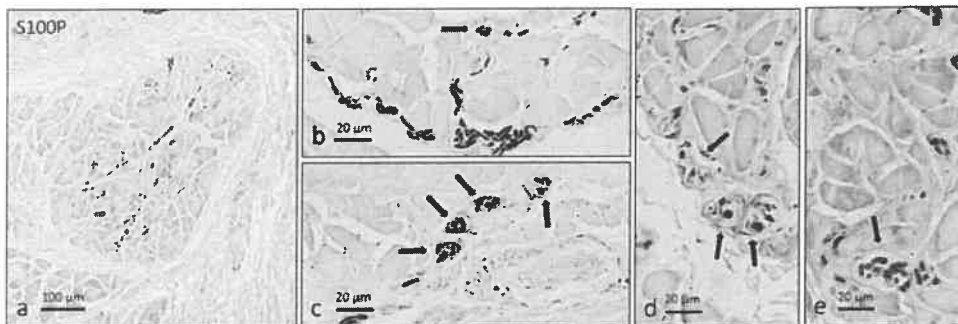


Figure 3.- Immunohistochemistry for the S100 protein. Different morphotypes of sensory nerve formations in the perimysium of the muscles of the upper (a-f) and lower (g-j) lips. Ruffini-like corpuscles (i) were occasionally observed.

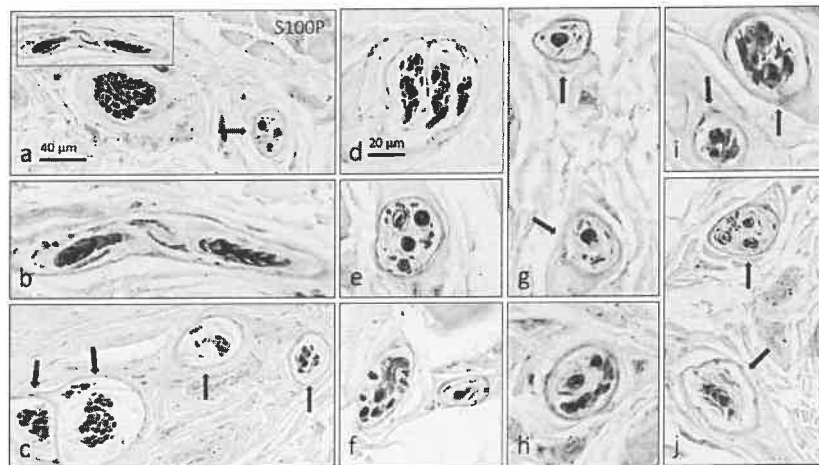
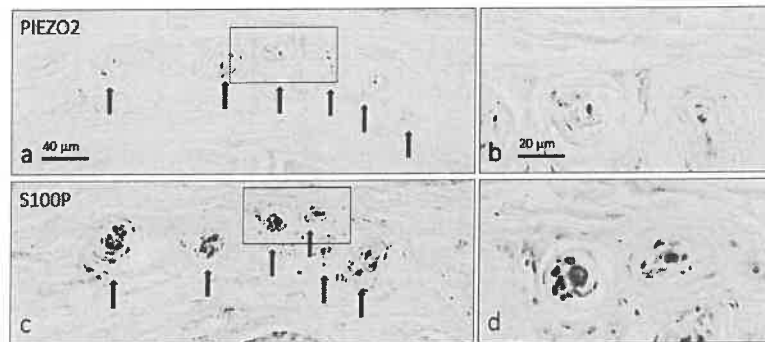


Figure 4.- Double immunofluorescence for S100 protein (green fluorescence) and CD-34 (red fluorescence) counterstained with DAPI (blue fluorescence). Images show Pacinian-like corpuscles. Objective: 63X/1.40 oil, pinhole 1.37, XY resolution 139.4 nm and Z resolution 235.8 nm.



Figure 5.- Approximate serial sections showing the location of mechanoprotein PIEZO2 (a,b) and protein S100P (c,d) in the sensory nerve formations of the human upper lip (arrows). The immunoreaction for PIEZO2 is localized to the axons of sensory nerve formations.



De: em.aanat.0.82464e.573dbd6c@editorialmanager.com
<em.aanat.0.82464e.573dbd6c@editorialmanager.com> en nombre de Annals of Anatomy
<em@editorialmanager.com>

Enviado: lunes, 23 de marzo de 2023 14:08

Para: JOSE ANTONIO VEGA ALVAREZ <javega@uniovi.es>

Asunto: [BULK] Ms. Ref. No.: AANAT5278R1

Annals of Anatomy

Title: Somatosensory innervation of the human lip with special reference to the vermillion

Authors: José Martín-Cruces *; Benjamín Martín-Biedma*; Yolanda García-Mesa; Patricia Cuendias; Juan J Gaité; Olivia García-Suárez; Juan L Cobo; Jose ANTONIO VEGA

Dear Professor Jose ANTONIO VEGA,

We are pleased to inform you that the article above refereed has been ACCEPTED for publication.

The PDF for your submission, "Somatosensory innervation of the human lip with special reference to the vermillion" has now been built and is ready for your approval. Please view the submission before approving it, to be certain that it is free of any errors. If you have already approved the PDF of your submission, this e-mail can be ignored.

To approve the PDF please login to the Editorial Manager as an Author:

<https://www.editorialmanager.com/aaanat/>

Your username is: javega@uniovi.es

Then click on the folder 'Submissions Waiting for Author's Approval' to view and approve the PDF of your submission. You may need to click on 'Action Links' to expand your Action Links menu.

You will also need to confirm that you have read and agree with the Elsevier Ethics in Publishing statement before the submission process can be completed. Once all of the above steps are done, you will receive an e-mail confirming receipt of your submission from the Editorial Office. For further information or if you have trouble completing these steps please go

to: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/88/p/7923.

Please note that you are required to ensure everything appears appropriately in PDF and no change can be made after approving a submission. If you have any trouble with the generated PDF or completing these steps please go

to: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/88/p/7923.

Your submission will be given a reference number once an Editor has been

assigned to handle it.

Kind regards,
Editorial Office
Annals of Anatomy

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EM via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

#AU_AANAT#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. ([Remove my information/details](#)). Please contact the publication office if you have any questions.

Annals of Anatomy

Somatosensory innervation of the human lip with special reference to the vermillion --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	AANAT5278
Article Type:	Research Article
Keywords:	lips, lip somatosensory innervation, glabrous skin, sensory corpuscles, PIEZO2, ASIC2
Corresponding Author:	Jose ANTONIO VEGA, Ph.D, M.D. Oviedo, SPAIN
First Author:	José Martín-Cruces *
Order of Authors:	José Martín-Cruces * Benjamín Martín-Biedma* Yolanda García-Mesa Patricia Cuendias Juan J Gaité Olivia García-Suárez Juan L Cobo Jose ANTONIO VEGA, Ph.D, M.D.
Abstract:	<p>Background: The lips are a part of the human face with special sensitivity for touch and thermal sensation. This study focuses on lip somatosensory innervation, especially on sensory corpuscles and the presence of the mechano-gated (ASIC2, PIEZO2 and TRPV4) and thermosensing (TRPV1, TRPM2 and TRPV8) ion channels in these structures. Methods: Five whole lips (3 upper and 2 lower) were obtained from non-embalmed frozen cadavers, then fixed in 10% formaldehyde and embedded in paraffin. The age range was 60 to 81 years (3 female and 2 male). Results: Different morphotypes of sensory corpuscles were found: Ruffini-like in the vicinity of the papillae of hair follicles, capsulated Meissner's and non-capsulated glomerular corpuscles in the vermillion, and sensory corpuscles of difficult morphological filiation in the oral mucosa. The density of sensory corpuscles in the vermillion was higher in the upper lip than in the lower lip: glomerular corpuscles predominate in the central and middle segments of lips whereas Meissner corpuscles were more abundant in the lateral segment. Regularly the axon of the glomerular and Meissner's corpuscles displayed ASIC2 and PIEZO2 immunoreactivity. TRPV1, TRPV4, TRPM2 and TRPV8 were non-detected. Conclusions: The current results demonstrate that the sensory corpuscles of the lips, especially the vermillion, are a mixture between those of the digital glabrous skin and the glabrous skin of other anatomical regions. The appearance of PIEZO2 and ASIC2 in their axons suggests that these sensory nerve formations are mechanosensory.</p>
Suggested Reviewers:	Paolo de Girolamo degirola@unina.it Nieves Martín-Alguacil nmartina@ucm.es Donald W. Pfaff pfaff@rockefeller.edu

Declaration of interest

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:



Jose Vega

José A. Vega, M.D., Ph.D.
Departamento de Morfología y Biología Celular
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud
C/ Julián Clavería, 6
33006 Oviedo, Spain
E-mail: javega@uniovi.es

1

2

3

4 **Somatosensory innervation of the human lip with special reference to**5 **the vermillion**

6

7 José Martín-Cruces^{1*}, Benjamín Martín-Biedma^{2*}, Yolanda García-Mesa¹, Patricia8 Cuendias¹, Juan J. Gaite³, Olivia García-Suárez¹, Juan L. Cobo^{1,3}, José A. Vega^{1,4}

9

10 ¹Departamento de Morfología y Biología Celular – Grupo SINPOs, Universidad de

11 Oviedo, Oviedo, Spain

12 ²Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas, Universidad de

13 Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

14 ³Unidad Dental, Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona, Spain15 ³Servicio de Cirugía Maxilofacial, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo,

16 Spain

17 ⁴Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Chile, Santiago de Chile,

18 Chile

19 *These authors contributed equally to this paper

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

To whom all correspondence should be addressed:

Prof. José A. Vega

javega@uniovi.es

30 **ABSTRACT. Objectives:** The lips are a part of the human face with special sensitivity
31 for touch and thermal sensation. This study focuses on lip somatosensory innervation,
32 especially on sensory corpuscles and the presence of the mechano-gated (ASIC2, PIEZO2
33 and TRPV4) and thermosensing (TRPV1, TRPM2 and RPM8) ion channels in these
34 structures. **Methods:** Five whole lips (3 upper and 2 lower) were obtained from non-
35 embalmed frozen cadavers, then fixed in 10% formaldehyde and embedded in paraffin.
36 The age range was 60 to 81 years (3 female and 2 male). **Results:** Different morphotypes
37 of sensory corpuscles were found: Ruffini-like in the vicinity of the papillae of hair follicles,
38 capsulated Meissner's and non-capsulated glomerular corpuscles in the vermillion, and
39 sensory corpuscles of difficult morphological filiation in the oral mucosa. The density of
40 sensory corpuscles in the vermillion was higher in the upper lip than in the lower lip:
41 glomerular corpuscles predominate in the central and middle segments of lips whereas
42 Meissner corpuscles were more abundant in the lateral segment. Regularly the axon of
43 the glomerular and Meissner's corpuscles displayed ASIC2 and PIEZO2
44 immunoreactivity. TRPV1, TRPV4, TRPM2 and TRPV8 were non-detected.
45 **Conclusions:** The current results demonstrate that the sensory corpuscles of the lips,
46 especially the vermillion, are a mixture between those of the digital glabrous skin and the
47 glabrous skin of other anatomical regions. The appearance of PIEZO2 and ASIC2 in their
48 axons suggests that these sensory nerve formations are mechanosensory.

49

50 **Keywords:** lips, lip somatosensory innervation, glabrous skin, sensory corpuscles,
51 PIEZO2, ASIC2

52

53 **1. Introduction**

54 The lips are a part of the human face essential for facial expression, mastication, speech
55 and phonation, touch and thermal sensation, physical attraction and sexuality. They are
56 two cutaneous-mucous folds that contain muscles, vessels and nerves (Hur et al., 2010;
57 Shim et al., 2008; Piccinin and Zito, 2022). The external surface of the lips consists of
58 hairy skin with abundant sweat and sebaceous glands, the internal surface is lined with a
59 moist mucous membrane, and the edges are covered with a transition epithelial layer
60 called the vermillion (see Boukoulas et al., 2017).

61 To carry out the functions in which the lips participate they are richly innervated. The
62 labial muscles are supplied by branches of the facial nerve, whereas the somatosensory
63 innervation depends on branches originated from the trigeminal nerve (Alsaad et al.,
64 2003; Hwang et al. 2004, 2007; Hu et al., 2006, 2007a,b). Both the facial skin and labial
65 mucosa are richly innervated (Corniani et al., 2020), but specially the vermillion (Rath
66 and Essick, 1990).

67 Regarding the microscopic somatosensory innervation of the lips it has been widely
68 investigated in different mammalian species like mouse (Yamamoto et al., 1981), rat
69 (Yamamoto et al., 1986; Tachibana et al., 1987a; Watanabe et al., 2013), cat and miniature
70 pig (Tachibana et al., 1989), dog (Tachibana et al., 1987a), *Monodelphis domestica*
71 (Schulze et al., 1983), or *Cebus apella* monkey (Iyomasa et al., 1978). In all these species
72 different morphotypes of sensory corpuscles were identified in the labial skin, vermillion
73 and labial mucosa (see also Watanabe, 2004). Nevertheless, data in humans are not too
74 abundant. Classical literature was updated 60 years ago by Seto (1963) who reported the
75 occurrence of “complex branched sensory terminations”, “uncapsulated glomerular
76 bodies”, “capsulated glomerular terminations (genital nerve body type I)” and “plexiform
77 sensory terminations”. More recently, Nolano et al. (2013) in samples of biopsied lips

78 observed abundant intraepithelial nerve fibres, pilo-neural complexes of unmyelinated
79 and myelinated fibres, and occasionally Meissner-like corpuscles, Merkel cell-neurite
80 complexes and Ruffini-like corpuscles.

81 On the other hand, results from studies of microneurography support the occurrence of
82 different categories of low-threshold mechanoreceptive afferents (LTMRs) innervating
83 the lips, including type I and type II slowly adapting (SA) LTMRs and type I rapidly
84 adapting (RA) LTMRs, but not type II RA LTMRs (Trulsson and Johansson, 2002;
85 Bukowska et al., 2010; Trulsson et al., 2010). Structurally they correspond to Merkel cell-
86 neurite complexes, Ruffini's corpuscles and Meissner corpuscles, respectively
87 (Zimmerman et al., 2014; Cobo et al., 2021).

88 Thus, the present study was designed to investigate the somatosensory innervation of the
89 adult human lips analyzing the kinds of sensory nerve formations, their
90 immunohistochemical profile (using a battery of antibodies against the different
91 constituents of the sensory corpuscles; see Cobo et al., 2021) and the occurrence within
92 them of several ion channels involved in mechanosensing (PIEZO2, acid-sensing ion
93 channel 2 -ASIC2- and transient receptor potential vanilloid 4 -TRPV4-) and temperature
94 detection (transient receptor potential melastatina 2 and 8 -TRPM2 and TRPM8- or
95 TRPV1) (see Martín-Alguacil et al., 2021). The study was aimed to provide basic
96 information about the somatosensation of the lips for clinicians and surgeons that
97 manipulate lips therapeutical or esthetical purposes (Baudoin et al., 2019; Wu et al., 2019;
98 Sabbah, 2022).

99 **2. Material and Methods**

100 2.1. *Material and tissue processing.* Upper (n = 3) and lower (n = 2) lip were obtained
101 from our laboratory collection (Registro Nacional de Biobancos, Sección colecciones,
102 Ref. C-0001627). The study was approved by the Ethical Committee for Biomedical

103 Research of the Principality of Asturias, Spain (Cod. CElm, PAst: Proyecto 266/18). The
104 age of the subjects was 66, 60, 72, 75 and 81 years (3 female and 2 male). The pieces were
105 originally removed from non-embalmed frozen cadavers, then fixed in 10%
106 formaldehyde and routinely embedded in paraffin. Now of the use lips were preserved in
107 blocks of paraffin and cut into serial sections 10 μm thick. Selected sections were stained
108 with Masson's trichrome to ascertain structural details.

109 *2.2. Methods. Single immunohistochemistry.* Deparaffinized and rehydrated sections were
110 processed for indirect immunohistochemistry using Leica Bond™ Polymer Refine
111 Detection Kit (Leica Biosystems™, Newcastle, UK) following the manufacturer's
112 instructions. The primary antibodies used are in Table 1. They included specific axonal
113 (neuron specific enolase: NSE), Schwann-related cell (S100 protein: S100P), endoneurial
114 (CD34 antigen) and perineurial (Glucose transporter 1: Glut1) markers. Furthermore, we
115 used antibodies PIEZO2, ASIC2, TRPV4, TRPV1, TRPM2 and TRPM8. Indirect
116 immunohistochemistry included several negative and positive controls as well as internal
117 positive and negative controls.

118 *3.3. Quantitative analyses.* The lips were divided into three zones: central (between both
119 philtrum ridges on the upper lip, and a central segment of 2 cm on the lower lip), lateral
120 (2 cm medial to the oral commissure), and middle (1 cm between medial and lateral
121 zones). Ten sections of each zone, 10 μm thick, 200 μm apart, processed detection of
122 S100P were used to identify sensory corpuscles. The sections were scanned by an
123 SCN400F scanner (Leica Biosystems), and the scans were computerized using SlidePath
124 Gateway LAN software (Leica Biosystems™). Then, in 5 randomly selected fields of 400
125 μm^2 each per section that included the vermillion, the number of sensory corpuscles were
126 counted by two independent observers (JM-C and JAV). Values are expressed as the

127 mean of sensory corpuscles by mm². Due to the low number of sampled corpuscles, no
128 statistical analysis was carried out.

129

130 3. Results

131 To systematically study the innervation of human lips, three territories have been
132 established: cutaneous, mucous and the transition between both, that is, the vermilion
133 (Fig. 1).

134 3.1. *Hairy skin*. The nerve apparatus of the hairs bulb was not studied because the outer
135 sheath and the perifollicular sheath were plucked or very altered as a result of the freezing
136 process and subsequent fixation of the pieces. Therefore, only the innervation of hair
137 papillae and the surrounding dermis associated is described here. Nerve fibres entering
138 the hair papillae were regularly observed, and in the dermis surrounding the papillae nerve
139 profiles as well as distinct types of sensory nerve formations were found (Fig. 2), most
140 identifiable as Ruffini-like corpuscles (Fig. 2b,c,f). In other cases, these were capsulated
141 formations formed by nerve fibre profiles of different calibers surrounded by a wide
142 intracapsular space (Fig. 2b). Apparently, the highest densities of sensory nerve
143 formations associated to the hair papilla were in the central zone of the lips, followed by
144 the lateral zone and the lowest in the middle zone. A quantitative study of the density of
145 sensory nerve formations due to the irregularity with which they occur was not carried
146 out on the labial skin.

147 3.2. *Vermillion*. In relation to the transitional epithelium of the vermilion two
148 morphotypes of sensitive corpuscles were found: Meissner's corpuscles and glomerular
149 corpuscles (Fig. 3). Meissner's corpuscles were located on the dermal papillae, at varying
150 distances from the epidermis. They were of different sizes and the laminar cells (glia
151 terminal) that form them, were not compact, nor were they arranged as stacks of flattened

152 sheets (classically described as a "coin stack"). In addition, the intensity of the
153 immunoreaction for S100P was not homogeneous, neither between corpuscles nor in the
154 same corpuscle, and was always weaker than that of the nerve fibres that supply them
155 (Fig. 4). The axons did not present the typical appearance among lamellar cells but a
156 glomerular and pointed appearance (Figs. 3 and 4). Characteristically, Meissner's
157 corpuscles were surrounded by a complete or partial layer of CD34-positive cells,
158 considered endoneural (Fig. 5); on the contrary, no peri-capsular immunoreaction of
159 Glut-1, considered as a specific marker of the perineurium (data not shown), was
160 demonstrated.

161 As for the glomerular corpuscles, with a "wool ball" or "yarn ball" appearance, they were
162 always located below the epidermis and both the marking of the terminal glial cells and
163 the axons presented a pattern of punctate immunolabeling (Figs. 2 and 3). In no case were
164 evidence of positive CD34 capsules framing these corpuscles were found.

165 The results of the quantitative analysis are summarized in Table 2. As can be show, and
166 as a rule, the density of glomerular corpuscles was higher than that of Meissner's
167 corpuscles in the central and middle segments, but lower in the lateral segment; and the
168 density of corpuscles was higher in the upper lip than in the lower lip.

169 Another aspect investigated was the presence of ion channels related to
170 mechanosensitivity in the vermilion sensory corpuscles. The presence of PIEZO2 was
171 detected in cells associated with hair follicles (Figs. 6) and located in the *stratum basale*
172 of the epithelium (Fig. 6c) that by their location can be identified as Merkel cells. In
173 addition, a fine immunolabeling, apparently axon pattern, was observed in some Meissner
174 (Fig. 6b) and glomerular (Fig. 6d) corpuscles. Axons showing immunoreaction for ASCI2
175 were also found in Meissner corpuscles but not in glomerular corpuscles (Fig. 6c-h).

176 3.3. *Mucosa*. In the labial submucosa sensory nerve formations of diverse types were
177 found. Occasionally they resembled glomerular formations, with dotted pattern and
178 immunoreaction for both axon and glial markers (Figs. 7a-b). In other cases, they formed
179 structures of difficult morphology, very irregular (Figs. 7c-d) or rounded (Fig. 7h).
180 Finally, isolated nerve fibres were found in the submucosa of the folds of the labial
181 mucosa (Figs. 7e-g).

182 It should be noted that in no case immunoreaction was detected in the sensory nerve
183 formations for Glut-1 or for the ion channels TRPV1, TRPV4, TRPM2 and TRPM8 (data
184 not shown).

185

186 4. Discussion

187 The present research was designed to analyze the innervation of human lips, with special
188 reference to vermilion. The work used a battery of antibodies to identify the axon (NSE
189 and NFP) and Schwann and terminal glial cells (S100P) of nerves and sensory nerve
190 formations, respectively. In addition, the distribution of endoneural (CD34 positive) and
191 perineural (Glut-1 positive) cell markers in these structures was studied. As indirect
192 evidence of the possible function of the sensory nerve formations, it was studied whether
193 any of their components, especially axons, expressed any ion channel related to
194 mechanosensation (ASIC2, PIEZO2 and TRPV4) or thermosensation (TRPV1, TRPM2
195 and TRPM8) (Cobo et al., 2021; Martin-Alguacil et al., 2021).

196 Recent studies on the microscopic innervation of human lips are almost non-existent,
197 except for the study by Nolano et al. (2013) who found in samples of biopsied lips
198 abundant intraepithelial nerve fibres, pilo-neural complexes of unmyelinated and
199 myelinated fibres, and occasionally Meissner-like corpuscles, Merkel cell-neurite
200 complexes and Ruffini-like corpuscles. Our results partially coincide with those of these

201 authors since we have found Ruffini-type corpuscles associated with the papilla of the
202 hair follicles, Meissner type corpuscles in the vermillion and other sensory formations of
203 difficult morphological filiation in the submucosa of the labial mucosa. But in no case
204 have complex Merkel-neurite cells been found. It is noteworthy that Nolano et al. (2013)
205 do not describe the presence of glomerular corpuscles that in our study are the most
206 abundant. Surely these discrepancies can be explained because we have analyzed whole
207 lips and they are only small biopsy samples.

208 There is general agreement that the vermillion is the most innervated part of the lips (Rath
209 and Essick, 1990) and our work has focused on it. Cutaneous afferents, and presumably
210 also vermillion ones, can be distinguished based on their sensory terminals, or sensory
211 corpuscles, and functionally classified based on the conduction speed of their action
212 potentials (Rice and Albrecht, 2008; Zimmerman et al., 2014; Cobo et al., 2021, Martin-
213 Alguacil et al., 2021). We have found Meissner corpuscles and glomerular corpuscles,
214 and in general the formers are more abundant in the outer third of the lips and the latter
215 in the inner two-thirds. As far as we know it is the first time that the sensitive corpuscles
216 are quantified in the vermillion. Meissner's corpuscles were similar but not the same as
217 those of glabrous skin: terminal glia have an irregular arrangement and not in "coin stack"
218 and their typical immunolabeling with S100P always showed a much lower intensity than
219 that of Schwann cells of the fibres that supply them. We cannot say why this is the case,
220 although it is possible that there are differences in the terminal glia of the sensitive
221 corpuscles according to the anatomical region (Suazo et al., 2022). On the other hand,
222 glomerular corpuscles had only previously been described with silver impregnation
223 techniques, and had been termed "uncapsulated glomerular bodies" and "capsulated
224 glomerular terminations (genital nerve body type I)" (Seto, 1963). The findings of our
225 study show that they are effectively not capsulated (they lack CD34 or Glu-1 cell

226 envelope) and morphologically resemble those that exist in the clitoris, although in this
227 location they do have a capsule (García-Mesa et al., 2021).

228 At the level of the labial mucosa, we have also observed some types of sensory nerve
229 formations of difficult morphological filiation and in scarce number. The predominant
230 sensory nerve formation was free nerve fibres of large caliber; Their possible function as
231 mechanoreceptors must be demonstrated.

232 The types of sensory corpuscles found in our studies at the cutaneous level (Ruffini-like
233 corpuscles in relation to the papillae of the hair follicles), in the vermillion (Meissner's
234 and glomerular corpuscles) and in the labial mucosa (not morphologically affiliated),
235 which could be the morphological support to the results of microneurography studies that
236 collect type II SA LTMRs and type I RA; however our results do not support the
237 registration of type I SA LTMRs (Trulsson and Johansson, 2002; Bukowska et al., 2010;
238 Trulsson et al., 2010). On the other hand, it is not known to which functional category the
239 glomerular corpuscles can be ascribed and, based on the present results that corpuscles
240 are responsible for the type II RA LTMRs. Probably, combinations of LTMRs are
241 responsible for the final mechanosensitivity of the lips.

242 Mechanotransduction in sensory corpuscles, involves mechano-gated ion channels (Wu
243 et al., 2017; Douguet and Honoré, 2019) , which have been detected in both axon and
244 terminal glial cells of human cutaneous sensory corpuscles (García-Mesa et al., 2017,
245 2021a,b, 2022a,b; Cobo et al., 2020). The axon of both Meissner and glomerular
246 corpuscles in the vermillion, as well as Merkel cells associated to hairs, display PIEZO2
247 and ASIC2 immunoreactivity like Meissner's corpuscles and glomerular corpuscles in
248 other cutaneous regions (Cabo et al., 2015; García-Mesa et al., 2017, 2021a,b). As far as
249 we know this is the first report of the occurrence of ASIC2 and PIEZO2 in the sensory
250 corpuscles of human lips.

251 Somatosensory afferents in the lips respond not only to contact with environmental
252 objects, but also to contact between the lips, changes in air pressure generated for speech
253 sounds, and to deformations that accompany lip during chewing and swallowing.
254 Furthermore, it has been proposed they provide proprioceptive information (Trulsson and
255 Johansson, 2002; Ito and Gomi, 2007). Nevertheless, this is doubted, and further studies
256 are necessary to clarify how and what is the proprioceptive system of the muscles of the
257 lips. On the other hand, it remains to be elucidated whether ion channels related to thermal
258 sensibility are also present in the human lips.

259

260 **Ethical statement**

261 This study was approved by the Ethical Committee for Biomedical Research of the
262 Principality of Asturias, Spain (Cod. CELm, PAst: Proyecto 266/18).

263 **Conflict of interest**

264 The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this
265 paper.

266 **Funding**

267 P.C. was supported by a Grant “Severo Ochoa Program” from the Govern of the
268 Principality of Asturias (PA-21-PF-BP20-122).

269 **Data availability statement**

270 The data that support the findings of this study are available from the corresponding
271 author upon reasonable request.

272 **Author contributions**

273 JM-P, YG- M, and PC performed the experiments. BM-B and OG-S collected the
274 material in compliance with ethical guidelines and performed part of the experiments.

275 JLC and OG-S conducted the quantitative analysis. JM-C and JAV designed the study,
276 analyzed the data, and wrote the manuscript.

277

278 **References**

- 279 Alsaad, K., Lee, T. C., McCartan, B. 2003. An anatomical study of the cutaneous
280 branches of the mental nerve. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 32, 325-33.
- 281 Baudoin, J., Meuli, J.N., di Summa, P.G., Watfa, W., Raffoul, W. 2019. A comprehensive
282 guide to upper lip aesthetic rejuvenation. *J Cosmet Dermatol.* 18, 444-50.
- 283 Boukovalas, S., Boson, A.L., Hays, J.P., Malone, C.H., Cole, E.L., Wagner, R.F. 2017.
284 A Systematic Review of Lower Lip Anatomy, Mechanics of Local Flaps, and Special
285 Considerations for Lower Lip Reconstruction. *J Drugs Dermatol.* 16, 1254-61.
- 286 Bukowska, M., Essick, G.K., Trulsson, M. 2010. Functional properties of low threshold
287 mechanoreceptive afferents in the human labial mucosa. *Exp Brain Res.* 20, 59-64.
- 288 Cabo, R., Alonso, P., Viña, E., Vázquez, G., Gago, A., Feito, J., Pérez-Moltó, F.J., García-
289 Suárez, O., Vega, J.A. 2015. ASIC2 is present in human mechanosensory neurons of
290 the dorsal root ganglia and in mechanoreceptors of the glabrous skin. *Histochem Cell*
291 *Biol.* 143, 267-76.
- 292 Cobo, R., García-Piqueras, J., Cobo, J., Vega, J.A. 2021. The Human Cutaneous Sensory
293 Corpuscles: An Update. *J Clin Med.* 10, 227.
- 294 Cobo, R., García-Piqueras, J., García-Mesa, Y., Feito, J., García-Suárez, O., Vega, J.A.
295 2020. Peripheral Mechanobiology of Touch-Studies on Vertebrate Cutaneous Sensory
296 Corpuscles. *Int J Mol Sci.* 21, 6221.
- 297 Corniani, G., Saal, H.P. 2020. Tactile innervation densities across the whole body. *J*
298 *Neurophysiol.* 124, 1229-40.

- 299 Douguet, D., Honoré, E. 2019. Mammalian Mechanoelectrical Transduction: Structure
300 and Function of Force-Gated Ion Channels. *Cell*. 179, 340-54.
- 301 García-Mesa, Y., Cárcaba, L., Coronado, C., Cobo, R., Martín-Cruces, J., García-
302 Piqueras, J., Feito, J., García-Suárez, O., Vega, J.A. 2021. Glans clitoris innervation:
303 PIEZO2 and sexual mechanosensitivity. *J Anat*. 238, 446-54.
- 304 García-Mesa, Y., Feito, J., Cuendias, P., García-Piqueras, J., Germanà, A., García-Suárez,
305 O., Martín-Biedma, B., Vega, J.A. 2022a. The acquisition of mechanoreceptive
306 competence by human digital Merkel cells and sensory corpuscles during
307 development: An immunohistochemical study of PIEZO2. *Ann Anat*. 243, 151953.
- 308 García-Mesa, Y., García-Piqueras, J., Cobo, R., Martín-Cruces, J., Suazo, I., García-
309 Suárez, O., Feito, J., Vega, J.A. 2021a. Sensory innervation of the human male
310 prepuce: Meissner's corpuscles predominate. *J Anat*. 239, 892-902.
- 311 García-Mesa, Y., García-Piqueras, J., Cuendias, P., Cobo, R., Martín-Cruces, J., Feito, J.,
312 García-Suarez, O., Biedma, B.M., Vega, J.A. 2022b. Synaptophysin is a selective
313 marker for axons in human cutaneous end organ complexes. *Ann Anat*. 243, 51955.
- 314 García-Mesa, Y., García-Piqueras, J., Cobo, R., Martín-Cruces, J., Suazo, I., García-
315 Suárez, O., Feito, J., Vega, J.A. 2021b. Sensory innervation of the human male
316 prepuce: Meissner's corpuscles predominate. *J Anat*. 239, 892-902.
- 317 Holden, A.C.L. 2020. Consumed by prestige: the mouth, consumerism, and the dental
318 profession. *Med Health Care Philos*. 23, 261-8.
- 319 Hu, K.S., Kwak, H.H., Song, C., Kang, H.J., Kim, C., Fontaine, C., Kim, H.J. 2006.
320 Branching patterns of the infraorbital nerve and topography within the infraorbital
321 space. *J Craniofac Surg*. 17, 1111-5.
- 322 Hu, K.S., Kwak, J., Koh, K.S., Abe, S., Fontaine, C., Kim, H.J. 2007a. Topographic
323 distribution area of the infraorbital nerve. *Surg Radiol Anat*. 29, 383-8.

- 324 Hu, K.S., Yun, H.S., Hur, M.S., Kwon, H.J., Abe, S., Kim, H.J. 2007b. Branching patterns
325 and intraosseous course of the mental nerve. *J Oral Maxillofac Surg.* 65, 2288-94.
- 326 Hur MS, Hu KS, Park JT, Youn KH, Kim HJ. 2010. New anatomical insight of the levator
327 labii superioris alaeque nasi and the transverse part of the nasalis. *Surg Radiol Anat.*
328 32, 753-6.
- 329 Hwang, K., Jin, S., Park, J.H., Chung, I.H. 2007. Cutaneous distribution of
330 zygomaticofacial nerve. *J Craniofac Surg.* 18, 575-7.
- 331 Hwang, K., Suh, M.S., Chung, I.H. 2004. Cutaneous distribution of infraorbital nerve. *J*
332 *Craniofac Surg.* 15, 3-5.
- 333 Ito, T., Gomi, H. 2007. Cutaneous mechanoreceptors contribute to the generation of a
334 cortical reflex in speech. *Neuroreport.* 18, 907-10.
- 335 Iyomasa, M.M., König, B. Jr., Watanabe, I.S. 1978. About the existence and endings of
336 nerve fibres in the *Cebus apella* monkey's upper lip. *Rev Bras Pesqui Med Biol.* 11,
337 209-12.
- 338 Kar, M., Muluk, N.B., Bafaqeeh, S.A., Cingi, C. 2018. Is it possible to define the ideal
339 lips? *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 38, 67-72.
- 340 Martín-Alguacil, N., de Gaspar, I., Schober, J.M., Pfaff, D.W., Vega, J.A. 2021.
341 *Somatosensation.* In: *Neuroscience in the 21st Century.* Pfaff D.W., Volkow N.D.,
342 Rubenstein J. (eds). Springer, New York, NY.
- 343 Nolano, M., Provitera, V., Caporaso, G., Stancanelli, A., Leandri, M., Biasiotta, A.,
344 Cruccu, G., Santoro, L., Truini, A. 2013. Cutaneous innervation of the human face
345 as assessed by skin biopsy. *Journal of anatomy.* 222, 161-169.
- 346 Piccinin, M.A., Zito, P.M. 2022. *Anatomy, Head and Neck, Lips.* 2022 Jun 11. In: *Stat*
347 *Pearls* [Internet]. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing.

- 348 Rath, E.M., Essick, G.K. 1990. Perioral somesthetic sensibility: do the skin of the lower
349 face and the midface exhibit comparable sensitivity? *J Oral Maxillofac Surg.* 48, 1181-
350 90.
- 351 Rice, F.L., Albrecht, P.J. 2008. Cutaneous mechanisms of tactile perception:
352 Morphological and chemical organization of the innervation to the skin, In: *The*
353 *senses: A comprehensive reference. Volume 6: Somatostatin* (eds Smith D, Firestein
354 S, Beauchamp G). San Diego, USA: Academic.
- 355 Sabbah, A. 2022. Smile Analysis: Diagnosis and Treatment Planning. *Dent Clin North*
356 *Am.* 66, 307-41.
- 357 Schulze, C., Spaethe, A., Halata, Z. 1993. The sensory innervation of the gingiva and
358 mucosa in *Monodelphis domestica*: an ultrastructural study. *Acta Anat (Basel)*. 146,
359 36-41.
- 360 Seto, H. 1963. Studies on the sensory innervation (Human sensibility). Igoku Shoin Ltd,
361 Tokyo.
- 362 Shim, K.S., Hu, K.S., Kwak, H.H., Youn, K.H., Koh, K.S., Fontaine, C., Kim, H.J. 2008.
363 An anatomical study of the insertion of the zygomaticus major muscle in humans
364 focused on the muscle arrangement at the corner of the mouth. *Plast Reconstr Surg.*
365 121, 466-73.
- 366 Suazo, I., Vega, J.A., García-Mesa, Y., García-Piqueras, J., García-Suárez, O., Cobo, T.
367 2022. The Lamellar Cells of Vertebrate Meissner and Pacinian Corpuscles:
368 Development, Characterization, and Functions. *Front Neurosci.* 16, 790130.
- 369 Tachibana, T., Fujiwara, N., Nawa, T. 1989. Intraperineural localization of lamellated
370 sensory corpuscles in the skin and oral mucosae of the adult cat and miniature pig. *J*
371 *Neurocytol.* 18, 61-9.

- 372 Tachibana, T., Ishizeki, K., Sakakura, Y. 1987a. Distinct types of encapsulated sensory
373 corpuscles in the oral mucosa of the dog: immunohistochemical and electron
374 microscopic studies. *Anat Rec.* 217, 90-8.
- 375 Tachibana, T., Sakakura, Y., Ishizeki, K., Nawa, T. 1987b. Nerve endings in the vermilion
376 border and mucosal areas of the rat lip. *Arch Histol Jpn.* 50, 73-85.
- 377 Trulsson, M., Essick, G.K. 2010. Sensations evoked by microstimulation of single
378 mechanoreceptive afferents innervating the human face and mouth. *J Neurophysiol.*
379 103, 1741-7.
- 380 Trulsson, M., Johansson, R.S. 2002. Orofacial mechanoreceptors in humans: encoding
381 characteristics and responses during natural orofacial behaviors. *Behav Brain Res.*
382 135, 27-33.
- 383 Watanabe, I.S. 2004. Ultrastructures of mechanoreceptors in the oral mucosa. *Anat Sci*
384 *Int.* 79, 55-61.
- 385 Watanabe, I.S., Dias, F.J., Mardegan, Issa. J.P., dos Santos, Haemmerle, C.A., Cury, D.P.,
386 Takada, S.H., Sosthenes, M.C., Pereira da Silva, M.C., Campos, L.M., Nogueira, M.I.,
387 Iyomasa, M.M. 2013. Immunohistochemistry and ultrastructural characteristics of
388 nerve endings in the oral mucosa of rat. *Microscopy (Oxf).* 62, 259-70.
- 389 Wu, J., Lewis, A.H., Grandl, J. 2017. Touch, Tension, and Transduction - The Function
390 and Regulation of Piezo Ion Channels. *Trends Biochem Sci.* 42, 57-71.
- 391 Wu, S.Q., Pan, B.L., An, Y., An, J.X., Chen, L.J., Li, D. 2019. Lip Morphology and
392 Aesthetics: Study Review and Prospects in Plastic Surgery. *Aesthetic Plast Surg.* 43,
393 637-43.
- 394 Yamamoto, T., Sakada, S. 1981. Distribution of sensory nerve endings in the labial
395 mucosa of the mouse. *Tohoku J Exp Med.* 135, 345-7.

396 Yamamoto, T., Tazaki, M., Sakada, S. 1986. Morphological study of the sensory
 397 innervation of the rat labial mucosa. *Tohoku J Exp Med.* 148, 229-38.
 398 Zimmerman, A., Bai, L., Ginty, D.D. 2014. The gentle touch receptors of mammalian
 399 skin. *Science.* 346, 950-4.

400

401

402

403

404 **Table 1.** Primary antibodies used in this study.

405

406	Antigen	Origin	Dilution	Supplier
408	ASIC2	Rabbit	1:200	LifeSpan BioSciences ¹
409	CD34 (clone QB-END/10)	Mouse	Prediluted	Master Diagnostica ²
410	Glut1	Rabbit	0.5 µg/ml	Cell Marque ³
411	NSE (clone BBS/NC/VI-H14)	Mouse	1:1000	Dako ⁴
412	NFP (clone 2F11)	Mouse	1:100	Dako ⁴
413	PIEZO2	Rabbit	1:200	Sigma-Aldrich ⁵
414	S100 protein (clone 4C4.9)	Mouse	1:1000	ThermoFisher Scientific ⁶
415	S100 protein	Rabbit	1:1000	Dako ⁴
416	TRPM2	Rabbit	1:100	ThermoFisher Scientific ⁶
417	TRPM8	Rabbit	1:200	Sigma-Aldrich ⁵
418	TRPV1	Rabbit	1:200	Sigma-Aldrich ⁵
419	TRPV4	Rabbit	1:200	LifeSpan BioSciences ¹

421
 422 Glut1: glucose transporter 1, NSE: neuron specific enolase, NFP: neurofilament protein

423 ¹Seattle, WA; ²Granada, Spain; ³Seattle, WA, USA; ⁴Glostrup, Denmark; ⁵Saint Louis,
 424 MS, USA; ⁶Freemont, CA, USA.

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441 **Table 2.** Density of sensory corpuscles in the human lips/mm². MC: Meissner corpuscles;
442 GC: glomerular corpuscles

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

		Central zone	Middel zone	Lateral zone
Upper lip	MC	4,35 ± 0,91	3,96 ± 1,02	4,12 ± 0,85
	GC	5,00 ± 1,32	5,34 ± 1,02	3,84 ± 0,95
Lower lip	MC	3,82 ± 0,86	3,76 ± 0,46	3,91 ± 0,77
		4,26 ± 1,20	4,31 ± 0,93	3,56 ± 0,84

462

463

464

465

466 **Legends for figures**

467 **Figure 1.-** Cross section of the central third of a human upper lip (left) where the skin (a),
468 the external segment (b) and internal (c) of the vermillion, and the labial mucosa (D) are
469 indicated enlarged. Masson's trichrome staining.

470 **Figure 2.-** Innervation of the dermal papilla and peripapillary dermis Associated with the
471 deep segments of the papilla are isolated nerve fibers (d) and sensory nerve formations
472 with different morphologies (b,c,f, and g) are enlargements of the squares in a and e),
473 many of them identifiable with Ruffini-like corpuscles. UL: upper lip; LL: lower lip.

474 **Figure 3.-** Main morphotypes of sensory nerve formations in the cutaneous-mucous
475 transcription epithelium of the vermillion. Meissner corpuscles have been observed
476 within the dermal papillae (black arrows) and subepidermal glomerular corpuscles (white
477 arrows). e: epidermis; UL: upper lip; LL: lower lip.

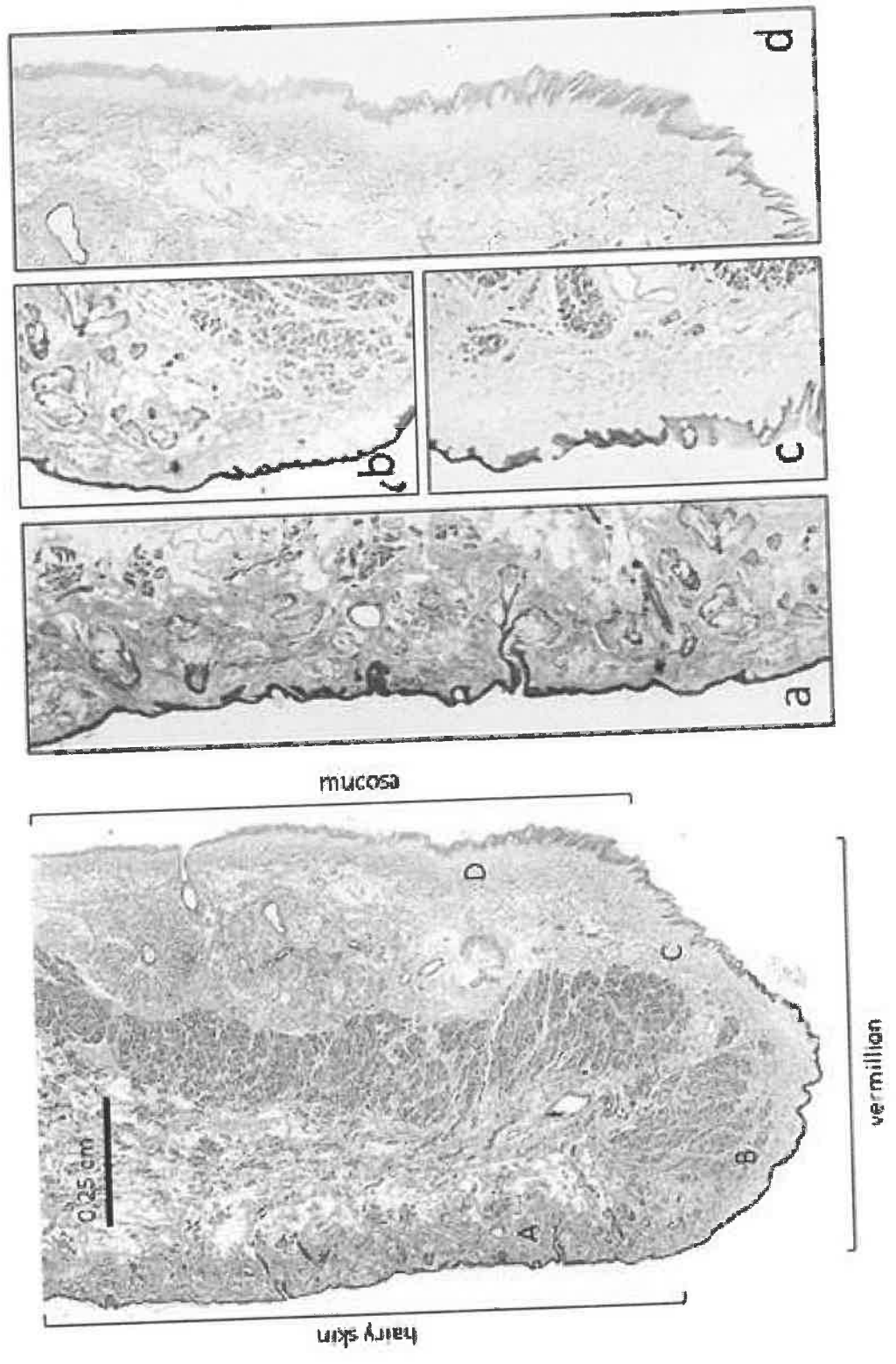
478 **Figure 4.-** Different morphotypes of Meissner and glomerular of sensory corpuscles
479 (arrows). The intensity of immunoreaction for the S100 protein was more intense in
480 Schwann cells of the fibers that supply the corpuscle than in corpuscular terminal glial
481 cells (lamellar cells). Immunolabeling for NSE showed a granular pattern of distribution.
482 e: epidermis; UL, upper lip; LL: lower lip.

483 **Figure 5.-** Meissner and glomerular sensory corpuscles (arrows) show a complete or
484 incomplete endoneurial capsule of CD-34 positive cells. No e: epidermis; UL: upper lip;
485 LL: lower lip.

486 **Figure 6.-.** Merkel associated to the hair papillae (a) and in the basal layer of the
487 epidermis (c) display immunoreactivity for PIEZO2, as well as some Meissner b) and
488 glomerular (d) corpuscles. Faint ASIC2 immunostaining was restricted to the axons of
489 Meissner corpuscles. e: epidermis.

490 **Figure 7.-** Immunohistochemical detection of NSE in submucous tissue (a-b), sensory
491 nerve formations difficult to catalogue morphologically (c,d and h) and isolated nerve
492 fibres (e-g).) UL: upper lip; LL: lower lip.

Figure 1



Martin-Cruces et al. FIG. 1

Figure 2

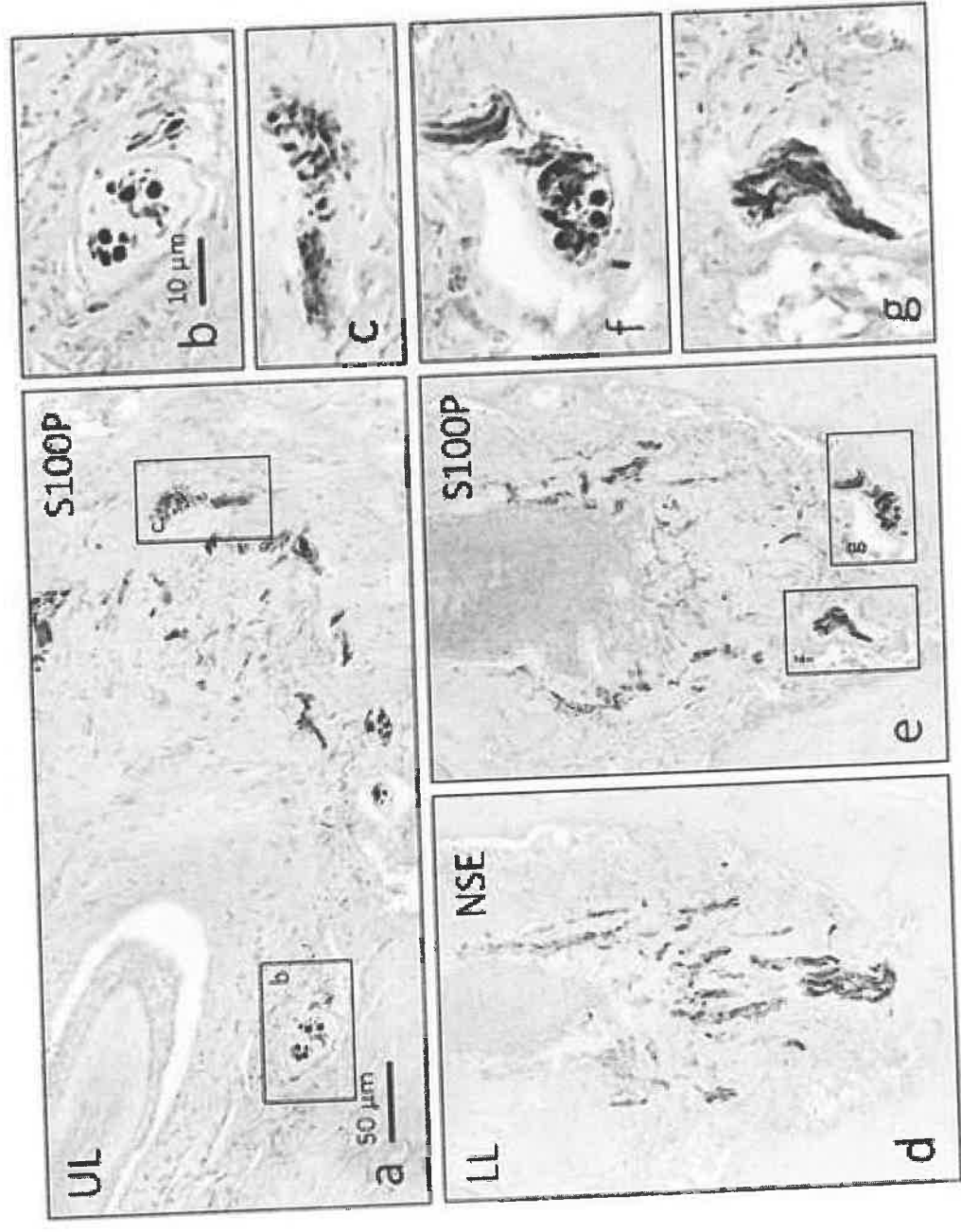
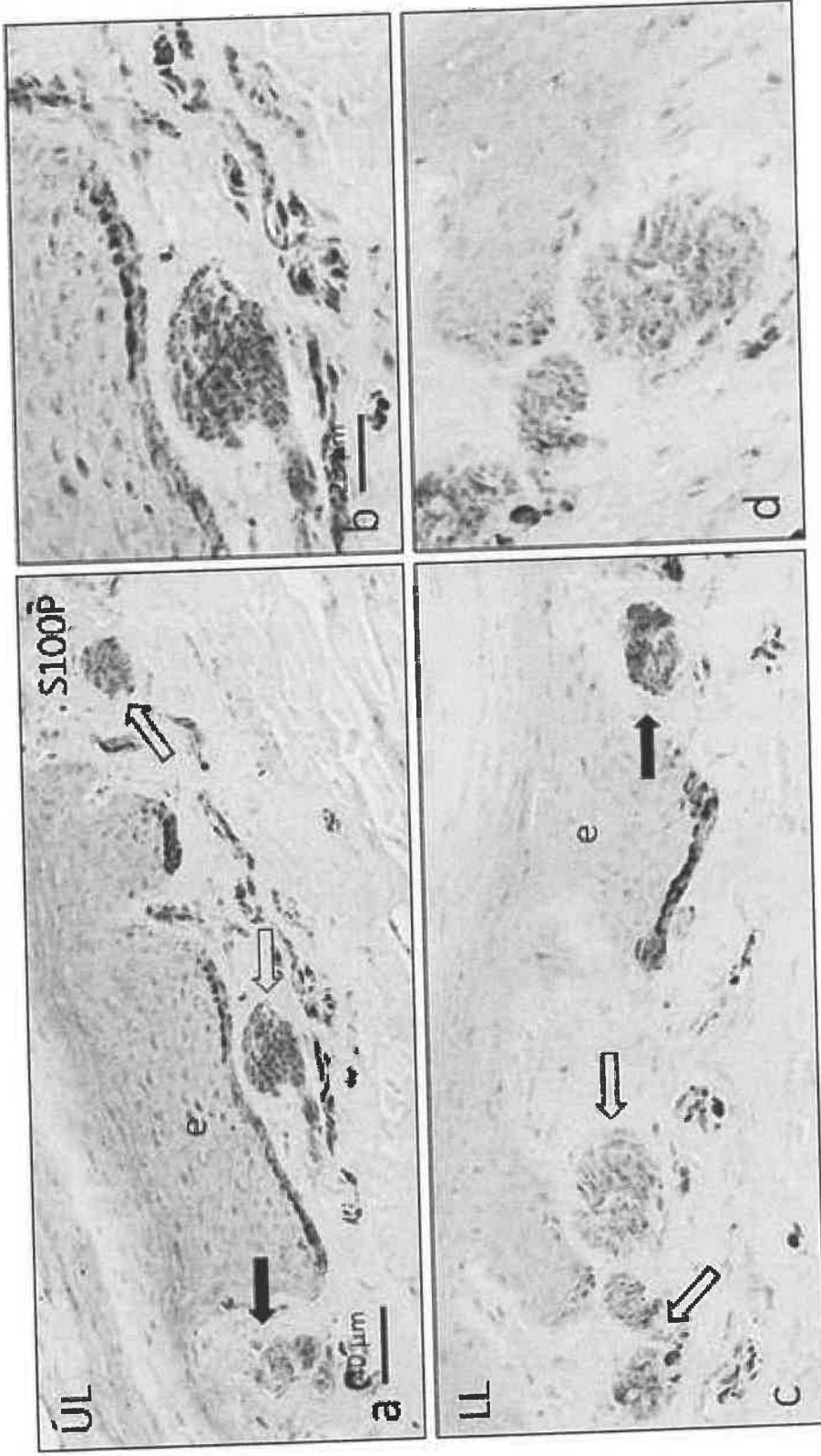


Figure 3



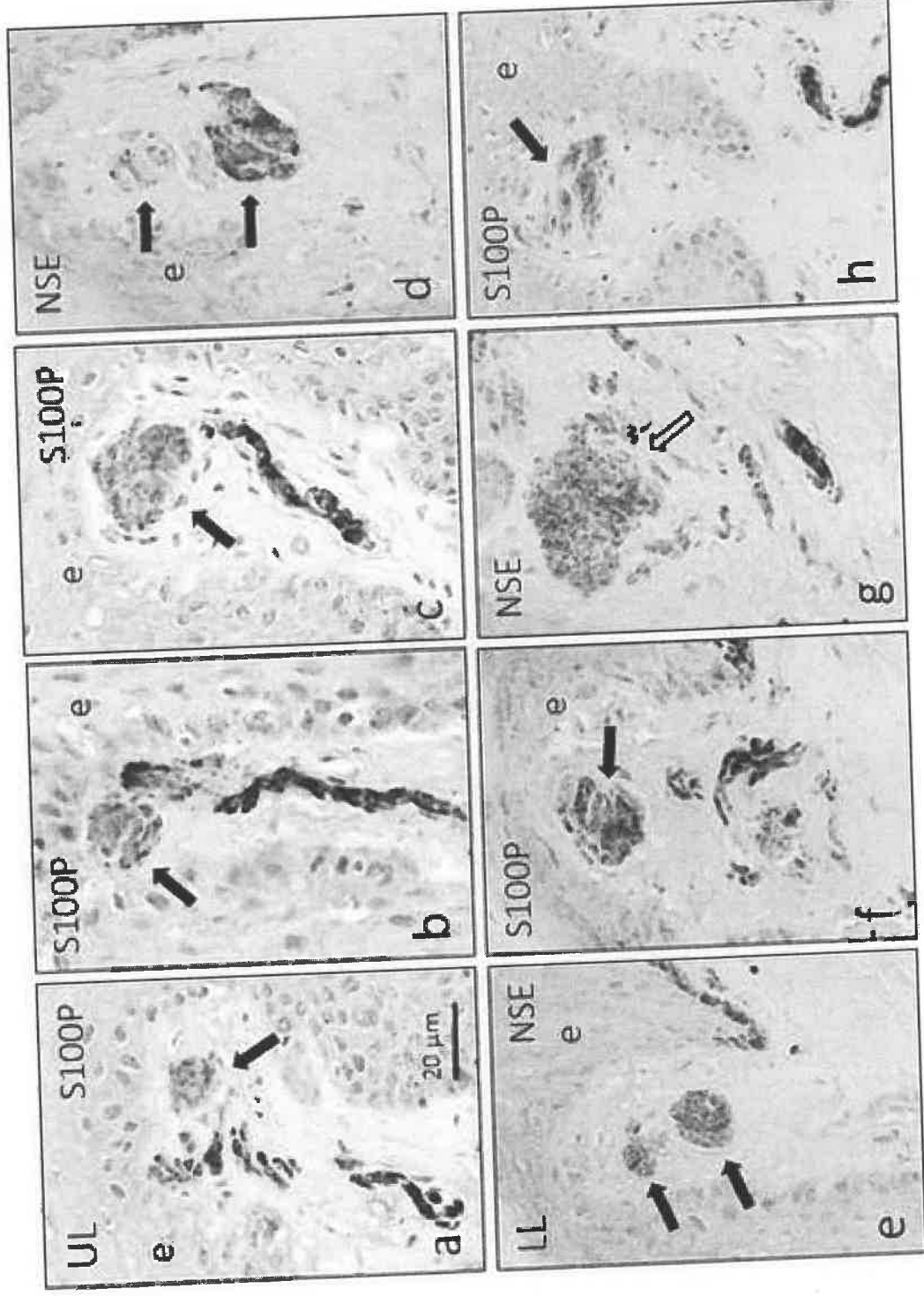


Figure 4

Figure 5

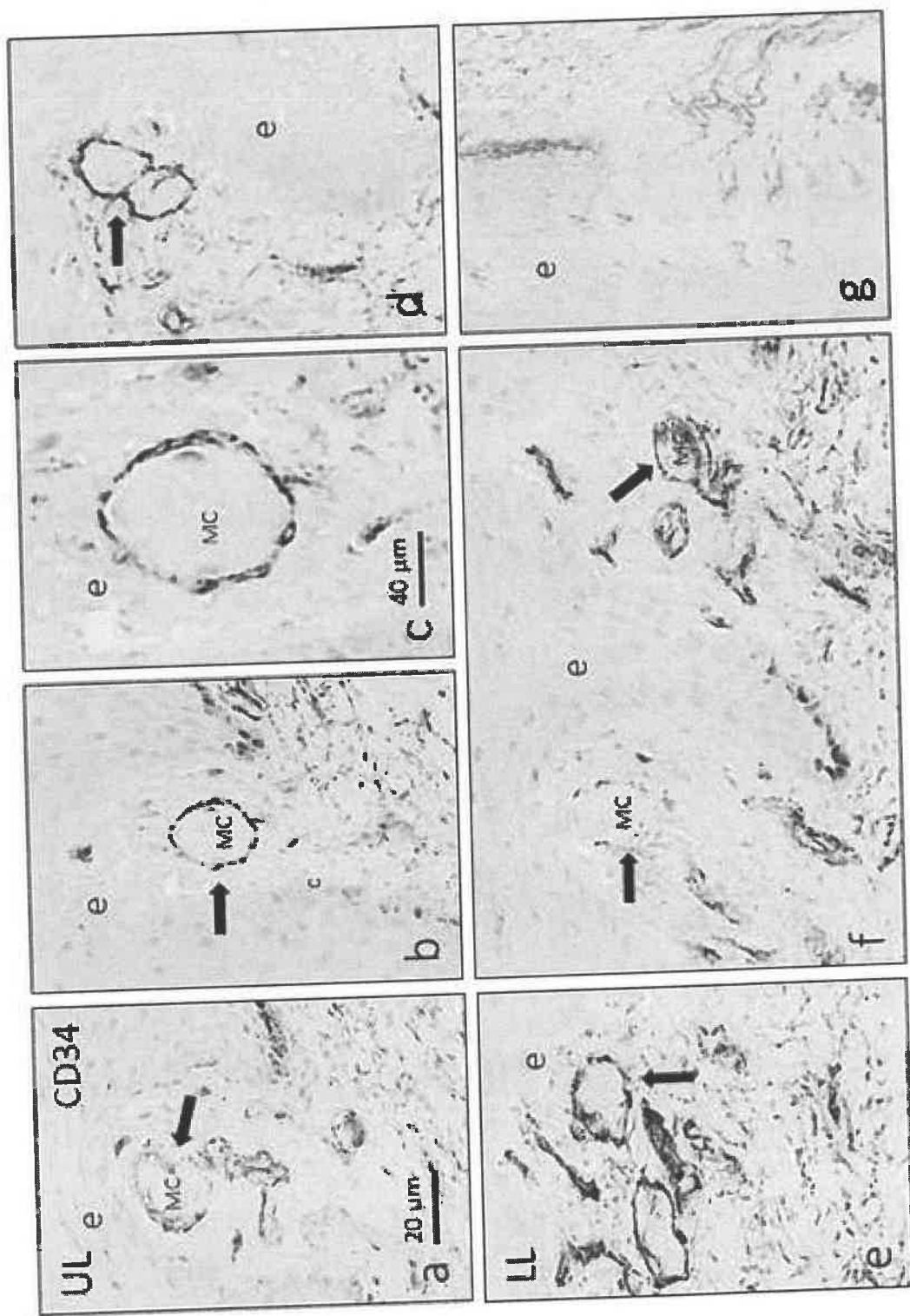
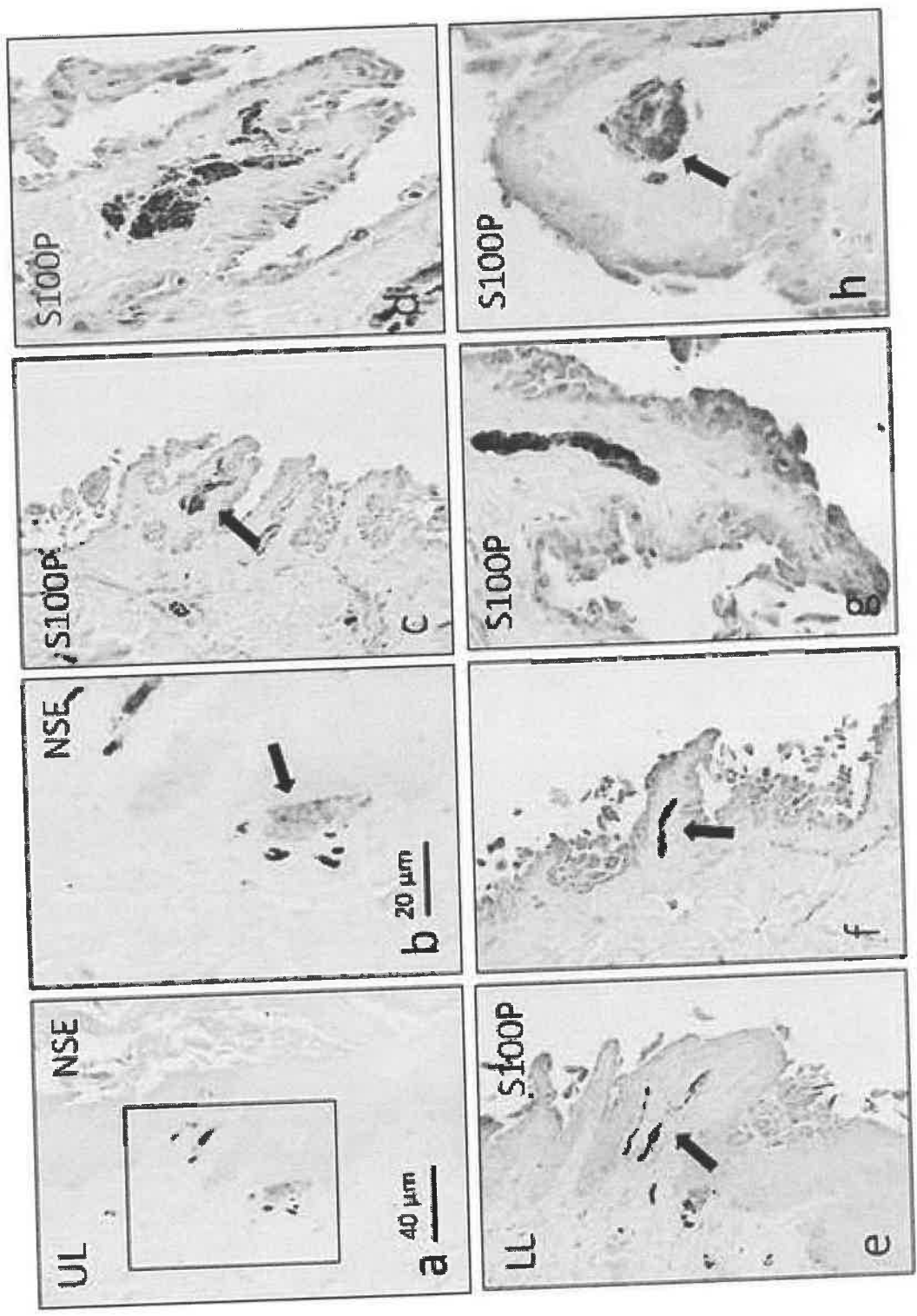


Figure 6



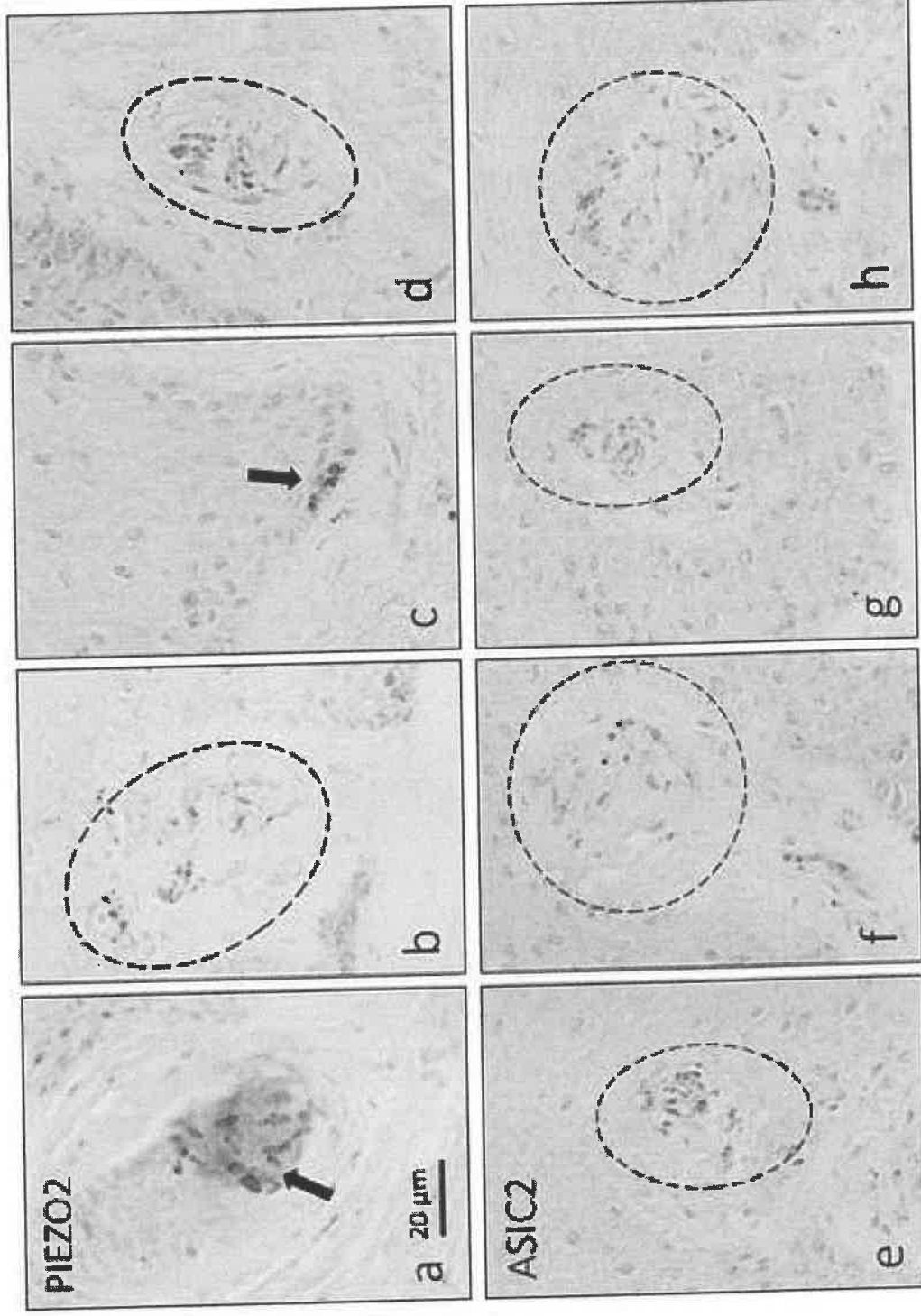


Figure 7

Ethical statement

This study was approved by the Ethical Committee for Biomedical Research of the Principality of Asturias, Spain (Cod. CEIm, PAst: Proyecto 266/18).

Funding

P.C. was supported by a Grant "Severo Ochoa Program" from the Govern of the Principality of Asturias (PA-21-PF-BP20-122).