



Universidad de Oviedo

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

PROGRAMA DE DOCTORADO  
CIENCIAS DE LA SALUD

Órganos de los sentidos y Sistema Nervioso Periférico

Tesis Doctoral

**CANALES IÓNICOS MECANONSENSIBLES PIEZO Y  
CIRCULACIÓN CEREBRAL**  
Estudios sobre el cuerpo y el seno carotídeos

**Elda María Alba Suárez**

Oviedo 2023



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

Tesis Doctoral

**CANALES IÓNICOS MECANONSENSIBLES PIEZO Y  
CIRCULACIÓN CEREBRAL**  
Estudios sobre el cuerpo y el seno carotídeos

**Elda María Alba Suárez**

Directores

**José A. Vega Álvarez  
Yolanda García Mesa**

Oviedo 2023





## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

<b>1.- Título de la Tesis Doctoral</b>	
Español: CANALES IÓNICOS MECANOSENSIBLES PIEZO Y CIRCULACIÓN CEREBRAL. Estudios sobre el cuerpo y el seno carotídeos	Inglés: PIEZO MECHANOSENSITIVE ION CHANNELS AND CEREBRAL CIRCULATION. Studies on the carotid body and sinus
<b>2.- Autor</b>	
Nombre: ELDA MARÍA ALBA SUÁREZ	
Programa de Doctorado: CIENCIAS DE LA SALUD	
Línea de Investigación: ORGANOS DE LOS SENSIDOS Y SISTEMA NERVIOSO PERIFERICO	
Órgano responsable: CENTRO INTERNACIONAL DE POSTGRADO	

### RESUMEN

**Introducción y estado actual del problema.** - Los barorreceptores y quimiorreceptores periféricos, especialmente el cuerpo carotídeo, detectan los cambios en la presión de la sangre, y cambios en los niveles sanguíneos de oxígeno (hipoxemia), dióxido de carbono (hipercapnia), pH (acidosis) y glucosa (hipoglucemia), respectivamente.

Aunque se conocen con bastante precisión los mecanismos de la detección mecánica en diferentes sistemas corporales, especialmente el tacto, no existe información sobre la presencia de mecanoproteínas en los terminales de los barorreceptores del seno carotídeo. En el seno aórtico de ratones se han detectado PIEZO1, PIEZO2 y tentonina; además, otros canales iónicos podrían estar implicados en la barorrecepción. En otro orden de cosas, se desconoce por completo si el cuerpo carotídeo puede tener funciones mecanoceptoras y algunas proteínas con estas propiedades se han detectado en el cuerpo carotídeo del ratón y rata, así como en el ganglio petroso.

De análisis de la literatura especializada se deduce que: 1) no existen datos en sobre la presencia de proteínas potencialmente mecanosensibles ni en las paredes del seno carotídeo humano ni en los barorreceptores que lo inervan; 2) los datos experimentales disponibles se centran en el seno aórtico y no existen referencias ni al seno carotídeo ni al cuerpo carotídeo; 3) no se ha explorado la presencia de proteínas mecanosensoras en el cuerpo carotídeo, aunque algunas con potencial mecanosensibilidad se han detectado en las células glómicas; y 4) en las neuronas sensitivas del ganglio petroso (que prestan inervación aferente tanto al cuerpo como al seno carotídeos) se expresan numerosas proteínas mecanosensibles y se puede hipotetizar que también lo hagan en sus extremos terminales aferentes.

Este trabajo de tesis doctoral se diseñó inicialmente para estudiar fundamentalmente la mecanosensibilidad de los vasos arteriales cerebrales. Sin embargo, la dificultad en la obtención de material en condiciones idóneas hizo que se limitara el estudio a la región de origen de la arteria carótida interna. Pero en última instancia, son el seno y el cuerpo carotídeos los que regular la circulación cerebral.

**Hipótesis y objetivos.** – Hipótesis: Los canales iónicos mecanosensibles de la familia PIEZO (PIEZO1 y PIEZO2), y algunos miembros de superfamilia TRP (transient receptor potential channels) con capacidad de detectar estímulos mecánicos (TRPA1, TRPC6, TRPM8, TRPV1 y TRPV4) intervienen en detección de las variaciones de la presión arterial, tanto en el seno como en el cuerpo carotídeo y, por tanto, deben de expresarse en las células de esos órganos y/o en los nervios que los suplen. **Objetivos:** El **objetivo general** es contribuir a conocimiento de los mecanismos por los cuales el seno y el cuerpo carotídeos humanos detecta las variaciones en presión arterial. Como **objetivos específicos** se han propuesto los siguientes: 1.- Estudiar la distribución de las mecanoproteínas PIEZO1 y PIEZO2 en el seno carotídeo y en el cuerpo carotídeo; 2.- Estudiar la distribución de las proteínas mecanosensibles (TRPA1, TRPC6, TRPM8, TRPV1 y TRPV4) de la superfamilia TRP en el seno carotídeo y en el cuerpo carotídeo; 3.- Estudiar la distribución de las mecanoproteínas PIEZO1 y PIEZO, y de las proteínas mecanosensibles (TRPA1, TRPC6, TRPM8, TRPV1 y

TRPV4) en el ganglio petroso y en el ganglio simpático cervical superior humanos, que es donde se localizan los somas aferentes y eferentes, respectivamente, que inervan el seno y el cuerpo carotídeos.

**Material y técnicas.** - Se utilizaron piezas de 8 donantes multiorgánicos (5 hombres y 3 mujeres), con edades comprendidas entre los 38 y 68 años, fallecidos en accidentes de tráfico que contenían la bifurcación de la arteria carótida común y el cuerpo carotídeo procedentes del Hospital Universitario Central de Asturias. Además, se incluyeron en el estudio el ganglio petroso (n = 6) y el ganglio simpático cervical superior (n = 4) de los mismos sujetos. El material se obtuvo de conformidad con la Legislación española (RD 1301/2006; Ley 14/2007; RD 1716/2011; Orden ECC/1404/2013) y las directrices de la Declaración de Helsinki II. Las muestras se fijaron en formaldehído al 10 % en PBS 0,1 M, pH 7,4 durante 24 h a 4° C, se deshidrataron y se incluyeron de forma rutinaria en parafina. En el momento del uso, los bloques de parafina se cortaron en secciones seriadas de 10µm de espesor y se montaron sobre portas gelatinizados.

**Inmunohistoquímica simple mediante el método PAP:** Para detectar la expresión de proteínas ASIC en el cuerpo carotídeo se utilizó el método de inmunohistoquímica indirecta peroxidasa-antiperoxidasa. Las secciones se incubaron durante toda la noche en una cámara húmeda a 4° C con anticuerpos primarios que se recogen en la tabla 1.

**Inmunofluorescencia con microscopía confocal:** Las secciones también se procesaron para la detección simultánea de los diferentes ASICs con proteínas específicas para el marcaje de los axones (NSE, NFP), células Schwann-like (proteína S100; S100P) y vesículas de neurotransmisores (sinaptofisina; Syn). Las secciones se incubaron con una mezcla 1:1 v/v de anticuerpo policlonal contra ASIC y anticuerpos monoclonales contra NSE, NFP y Syn en una cámara húmeda durante la noche a 4 °C. Después de lavar con TBS, las secciones se incubaron durante una hora con IgG anti-conejo bovino conjugado con CFL488 (diluido 1:200) y luego, enjuagado e incubado nuevamente durante otra hora con anticuerpo anti-ratón de burro conjugado con CyTM3 (diluido 1:100). Ambos pasos se realizaron en cámara húmeda oscura a temperatura ambiente. Las secciones finalmente se lavaron y los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (10 ng/mL). La triple fluorescencia se detectó utilizando un microscopio de fluorescencia automático Leica DMR-XA (Microscopía fotónica y Proceso de imagen, Servicios científico-técnicos, Universidad de Oviedo) junto con un software Leica Confocal (versión 2.5; Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Alemania), y las imágenes capturadas se procesaron con el software Image J (versión 1.43 g; Master Biophotonics Facility, Mac Master University Ontario; www.macbiophotonics.ca, acceso el 11 de enero de 2021).

Antígeno	Especie	Dilución	Obtenido de
PIEZO1	Conejo	1:200	Alomone <sup>1</sup>
PIEZO2	Conejo	1:200	Sigma-Aldrich <sup>2</sup>
TRPA1	Conejo	1:100	Ab Serotec <sup>3</sup>
TRPC6	Conejo	1:100	Novus Biologicals Inc <sup>4</sup>
TRPM8	Conejo	1:200	Abcam <sup>5</sup>
TRPV1	Conejo	1:200	Gentaur Europe BVBA <sup>5</sup>
TRPV4	Conejo	1:200	Abcam <sup>1</sup>
NSE (clone BBS/NC/VI-H14)	Ratón	1:500	Dako <sup>6</sup>
NFP (clone 2F11)	Ratón	1:200	Roche <sup>7</sup>
Sinaptofisina (clone 27G12)	Ratón	Prediluido	Leica Biosystems <sup>8</sup>
S100 P	Ratón	1:500	Dako <sup>6</sup>

<sup>1</sup>Cambridge, UK; <sup>2</sup>Seattle, WA, USA; <sup>3</sup>Glostrup, Denmark; <sup>4</sup>Viena, Austria; <sup>5</sup>Madrid, Spain.

**Resultados y Discusión.** - La estructura del seno carotídeo humana es la de una arteria de paredes adelgazadas sobre todo a expensas de la capa muscular; la del cuerpo carotídeo es en glomérulos y lóbulos glómicos; las células principales o de tipo I se disponen en clusters y fueron positivas para la NSE y la SYN, mientras que las células de tipo II, se disponían en la parte periférica de los glomérulos y fueron positivas para S100P. La inmunorreacción para NFP, utilizada para evidenciar la inervación del cuerpo carotídeo, puso en evidencia que esta proteína sólo marca parcialmente el aparato nervioso del órgano.

En ningún caso se detectó inmunorreacción para TRPC6 y TRPA1. PIEZO1, PIEZO2, TRPV4 y TRV1 se localizan en formaciones sensitivas de distintas morfologías en la adventicia del seno cavernoso. No se detectó en esta localización TRPM8. En el cuerpo carotídeo (tabla 2) PIEZO1 estaba prácticamente ausente; PIEZO2 dos se detectó en nervios y una subpoblación de neuronas tipo I; los mismos resultados se obtuvieron para

TRPM8, TRPV4 y TRPV1. No es descartable la presencia de todas estas mecanoproteínas en las células de tipo II del cuerpo carotídeo.

**Tabla 2.-** % de área inmunorreactiva para las proteínas estudiadas y % de área de emergencia con los marcadores nerviosos y de las células de tipo I.

	PIEZO1	PIEZO2	TRPM8	TRPV1	TRPV4
Área total (fluorescencia verde) %	1,1 ± 0,9	58,1 ± 5,7	71,3 ± 8,1	62,3 ± 7,6%	61,1 ± 5,6
Área de emergencia %	1 ± 0,9	8,4 ± 2,2	37,7 ± 5,9	24,7 ± 8,1	42,8 ± 7,1

También se detectaron las proteínas investigadas en subpoblaciones neuronales de los ganglios petroso y simpático cervical superior (Tabla 3).

**Tabla 5.2.** Porcentajes de neurona que expresan las subunidades ASIC en el ganglio petroso y en el ganglio cervical superior

	PIEZO1	PIEZO2	TRPM8	TRPV1	TRPV4
Ganglio petroso	23%	86%	12%	44%	88%
	NP 19%	NP 16%	NP 31%	NP 80%	NP 14%
	NI 22%	NI 81%	NI 26%	NI 21%	NI 80%
	NG 8%	NG 100%	NG 14%	NG 100%	NG 100%
GSCS	71%	96%	63%	84%	93%

**Conclusiones:** 1.- Las formaciones nerviosas sensitivas de la adventicia del seno carotídeo forman diferentes morfotipos de terminales barorreceptores que incluyen terminaciones libres, terminaciones en flor, terminaciones arborescentes y corpúsculos laminares simples y Ruffini-like. 2.- Los terminales barorreceptores expresan inmunorreacción para las mecanoproteínas PIEZO1, PIEZO2, TRPV1 y TRPV4, pero no para TRPM8. Por tanto, los barorreceptores carotídeos humanos pueden realizar mecanotransducción mediante esas mecanoproteínas. 3.- La capa muscular de las paredes de las arterias carótidas expresan inmunorreacción para PIEZO1. 4.- Las formaciones nerviosas sensitivas, tanto libres como organizadas, de las capas adventicia y muscular de las arterias carótidas expresan las mecanoproteínas PIEZO1, PIEZO2, TRPV1 y TRPV4. 5.- Las mecano proteínas PIEZO1 y PIEZO2 se expresan de manera irregular en el cuerpo carotídeo. Mientras PIEZO1 no está presente en los nervios y prácticamente tampoco en las células de tipo I, PIEZO2 se detecta en nervios, una subpoblaciones de células tipo I y en las células de tipo II. Este resultado atribuye indirectamente potencial mecanorreceptor a las células glómicas gliales de tipo II. 6.- Los canales iónicos multifuncionales TRPM8, TRPV1 y TRPV4 se expresa en los nervios, células de tipo I y células del tipo II del cuerpo carotídeo humano. 7.- Las neuronas del ganglio petroso con tamaños en el rango propio de las neuronas mecanorreceptoras expresan inmunorreacción para PIEZO1, PIEZO2, TRPM8, TRPV1 y TRPV4. En el ganglio simpático cervical superior, se detectó inmunorreacción en la mayoría de los somas neuronales para PIEZO1, PIEZO2, TRPV1 y TRPV4, y en menor proporción para TRPM8.

## SUMMARY

**Introduction and state of the art.** - Peripheral baroreceptors and chemoreceptors, especially the carotid body, detect changes in blood pressure, and changes in blood levels of oxygen (hypoxemia), carbon dioxide (hypercapnia), pH (acidosis), and glucose (hypoglycemia), respectively.

Although the mechanisms of mechanical sensing in different body systems, especially touch, are fairly well known, there is no information on the presence of mechanoproteins in carotid sinus baroreceptor terminals. PIEZO1, PIEZO2 and tentonin have been detected in the aortic sinus of mice; In addition, other ion channels may be involved in baroreception. On the other hand, it is completely unknown whether the carotid body can have mechanoreceptor functions and some proteins with these properties have been detected in the carotid body of mice and rats, as well as in the petrosal ganglion.

From the analysis of the specialized literature, it can be deduced that: 1) there are no data on the presence of potentially mechanosensitive proteins in the walls of the human carotid sinus or in the baroreceptors that innervate it; 2) the available experimental data focus on the aortic sinus and there are no references to either the carotid sinus or the carotid body; 3) the presence of mechanosensing proteins in the carotid body has not been explored, although some with potential mechanosensitivities have been detected in glomic cells; and 4) in the sensory neurons of the petrosal ganglion (which provide afferent innervation to both the carotid body and the carotid sinus) numerous mechanosensitive proteins are expressed and it can be hypothesized that they also do so at their afferent terminal ends.

This doctoral thesis work was initially designed to study fundamentally the mechanosensitivity of cerebral arterial vessels. However, the difficulty in obtaining material in ideal conditions meant that the study was limited to the region of origin of the internal carotid artery. But ultimately, it's the carotid sinus and body that regulate cerebral circulation.

**Hipótesis y objetivos.** – Hipótesis: Los canales iónicos mecanosensibles de la familia PIEZO (PIEZO1 y PIEZO2), and some members of the TRP (transient receptor potential channels) superfamily with the ability to detect mechanical stimuli (TRPA1, TRPC6, TRPM8, TRPV1 and TRPV4) are involved in detecting blood pressure variations, both in the breast and in the carotid body and, therefore, must be expressed in the cells of these organs and/or in the nerves that supply them. Objectives: The **general objective** is to contribute to the knowledge of the mechanisms by which the human carotid sinus and body detect variations in blood pressure. The following **specific objectives** have been proposed: 1.- To study the distribution of the mechanoproteins PIEZO1 and PIEZO2 in the carotid sinus and carotid body; 2.- To study the distribution of mechanosensitive proteins (TRPA1, TRPC6, TRPM8, TRPV1 and TRPV4) of the TRP superfamily in the carotid sinus and carotid body; 3.- To study the distribution of the mechanoproteins PIEZO1 and PIEZO, and the mechanosensitive proteins (TRPA1, TRPC6, TRPM8, TRPV1 and TRPV4) in the human petrosal ganglion and in the upper cervical sympathetic ganglion, which is where the afferent and efferent somas are located, respectively, which innervate the carotid sinus and body.

**Material and techniques.** - Specimens from 8 multi-organ donors (5 men and 3 women), aged between 38 and 68 years, who died in traffic accidents containing the bifurcation of the common carotid artery and the carotid body from the Central University Hospital of Asturias, were used. In addition, the petrosal ganglion (n = 6) and upper cervical sympathetic ganglion (n = 4) of the same subjects were included in the study. The material was obtained in accordance with Spanish legislation (RD 1301/2006; Law 14/2007; RD 1716/2011; Order ECC/1404/2013) and the guidelines of the Declaration of Helsinki II. Samples were fixed in 10% formaldehyde at PBS 0.1 M, pH 7.4 for 24 h at 4°C, dehydrated, and routinely enclosed in paraffin. At the time of use, the paraffin blocks were cut into serial sections 10µm thick and mounted on gelatinized holders.

Simple immunohistochemistry using the PAP method: To detect the expression of ASIC proteins in the carotid body, the indirect immunohistochemistry peroxidase-antiperoxidase method was used. The sections were incubated overnight in a humid chamber at 4°C with primary antibodies listed in Table 1.

Immunofluorescence with confocal microscopy: The sections were also processed for the simultaneous detection of the different ASICs with specific axon labeling proteins (NSE, NFP), Schwann-like cells (S100 protein; S100P) and neurotransmitter vesicles (synaptophysin; Syn). Sections were incubated with a 1:1 v/v mixture of polyclonal antibody against ASIC and monoclonal antibodies against NSE, NFP and Syn in a humid chamber overnight at 4 °C. After washing with TBS, the sections were incubated for one hour with anti-bovine rabbit IgG conjugated with CFL488 (diluted 1:200) and then rinsed and incubated again for another hour with anti-donkey mouse antibody conjugated with CyTM3 (diluted 1:100). Both steps were performed in a dark humid chamber at room temperature. The sections were finally washed and the cell nuclei stained with DAPI (10 ng/mL). Triple fluorescence was detected using a Leica DMR-XA automatic fluorescence microscope (Photonic Microscopy and Image Processing, Scientific-Technical Services, University of Oviedo) together with Leica Confocal software (version 2.5; Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Germany), and the captured images were processed using Image J software (version 1.43 g; Master Biophotonics Facility, Mac Master University Ontario; www.macbiophotonics.ca, accessed January 11, 2021).

Antigen	Source	Dilution	Purchased from
PIEZO1	Rabbit	1:200	Alomone <sup>1</sup>
PIEZO2	Rabbit	1:200	Sigma-Aldrich <sup>2</sup>
TRPA1	Rabbit	1:100	Ab Serotec <sup>3</sup>



TRPC6	Rabbit	1:100	Novus Biologicals Inc <sup>4</sup>
TRPM8	Rabbit	1:200	Abcam <sup>5</sup>
TRPV1	Rabbit	1:200	Gentaur Europe BVBA <sup>5</sup>
TRPV4	Rabbit	1:200	Abcam <sup>1</sup>
NSE (clone BBS/NC/VI-H14)	Mouse	1:500	Dako <sup>6</sup>
NFP (clone 2F11)	Mouse	1:200	Roche <sup>7</sup>
Sinaptofisina (clone 27G12)	Mouse	Prediluido	Leica Biosystems <sup>8</sup>
S100 P	Mouse	1:500	Dako <sup>6</sup>

<sup>1</sup>Cambridge, UK; <sup>2</sup> Seattle, WA, USA; <sup>3</sup>Glostrup, Denmark; <sup>4</sup>Viena, Austria; <sup>5</sup>Madrid, Spain.

**Results and Discussion.** - The structure of the human carotid sinus is that of an artery with thinned walls, especially at the expense of the muscular layer; that of the carotid body is in glomeruli and glomus lobes; the main or type I cells were arranged in clusters and were positive for NSE and SYN, while the type II cells were arranged in the peripheral part of the glomeruli and were positive for S100P. The immunoreaction for NFP, used to evidence the innervation of the carotid leather, showed that this protein only partially marks the nervous system of the organ.

In no case was immunoreaction detected for TRPC6 and TRPA1. PIEZO1, PIEZO2, TRPV4 and TRV1 are located in sensory formations of different morphologies in the adventitia of the cavernous sinus. TRPM8 was not detected at this location. In the carotid body (Table 2), PIEZO1 was practically absent; PIEZO2 two were detected in nerves and a subpopulation of type I neurons; the same results were obtained for TRPM8, TRPV4 and TRPV1. The presence of all these mechanoproteins in type II cells of the carotid body cannot be ruled out.

**Table 2.-** % of immunoreactive area for the proteins studied and % of area of merge with nerve markers and type I cells.

	PIEZO1	PIEZO2	TRPM8	TRPV1	TRPV4
Total area (green fluorescence) %	1,1 ± 0,9	58,1 ± 5,7	71,3 ± 8,1	62,3 ± 7,6%	61,1 ± 5,6
Merge area %	1 ± 0,9	8,4 ± 2,2	37,7 ± 5,9	24,7 ± 8,1	42,8 ± 7,1

Tambien se detectaron las proteínas investigadas en subpoblaciones neuronales de los ganglios petroso y simpático cervical superior (Tabla 3).

**Tabla 5.2.** Porcentajes de neurona que expresan las subunidades ASIC en el ganglio petroso y en el ganglio cervical superior

	PIEZO1	PIEZO2	TRPM8	TRPV1	TRPV4
Petrosal ganglion	23%	86%	12%	44%	88%
	NP 19%	NP 16%	NP 31%	NP 80%	NP 14%
	NI 22%	NI 81%	NI 26%	NI 21%	NI 80%
	NG 8%	NG 100%	NG 14%	NG 100%	NG 100%
Sympathetic ganglion	71%	96%	63%	84%	93%

**Concluding remarks:** 1.- The sensory nerve formations of carotid sinus adventitia forms different morphotypes of baroreceptor terminals that include free endings, flowering endings, arborescent endings, and simple and Ruffini-like lamellar corpuscles. Baroreceptor terminals express immunoreaction for the mechanoproteins PIEZO1, PIEZO2, TRPV1 and TRPV4, but not for TRPM8. Therefore, human carotid baroreceptors can perform mechanotransduction using these mechanoproteins. The muscular layer of carotid artery walls expresses immunoreaction to PIEZO1. The sensory nerve formations, both free and organized, of the adventitious and muscular layers of the carotid arteries express the mechanoproteins PIEZO1, PIEZO2, TRPV1 and TRPV4. The mechanoproteins PIEZO1 and PIEZO2 are irregularly expressed in the carotid body. While PIEZO1 is not present in nerves and virtually not in type I cells, PIEZO2 is detected

in nerves, a subpopulation of type I cells, and in type II cells. This result indirectly attributes mechanoreceptor potential to glial cells type II. The multifunctional ion channels TRPM8, TRPV1 and TRPV4 are expressed in nerves, type I cells and type II cells of the human carotid body. Petrosal ganglion neurons with sizes in the proper range of mechanoreceptor neurons express immunoreaction to PIEZO1, PIEZO2, TRPM8, TRPV1 and TRPV4. In the upper cervical sympathetic ganglion, immunoreaction was detected in most neuronal somas for PIEZO1, PIEZO2, TRPV1 and TRPV4, and to a lesser extent for TRPM8.

“A mi Hijo “

A mi hijo, luz de la noche, equilibrio en mis vaivenes, Ilusión mantenida:  
Por hacer más valioso el camino; por limpiar mi reflejo en su espejo, por desear  
prolongar el presente, por anhelar un largo futuro.

A mi esposo: Por su fortaleza, por su integridad, por no cegar en la noche,  
por dejarse querer.

A mis padres: por intuirme, por estar, por ser.

A mis abuelos: porque, aunque no me dieron la vida, me enseñaron a vivirla.

A quien me quiere. A quienes saben que los quiero:

GRACIAS.



## Agradecimientos

Quiero agradecer sinceramente al Dr. José Antonio Vega; Decano de la facultad de Medicina, catedrático de Anatomía y Embriología Humana, por aceptar ser el Director de mi Tesis. Es un honor.

Gracias por no medir mi tiempo en su valioso y ocupado día. Por ayudarme a visualizar el conocimiento desde distintos ángulos, por enseñarme a encontrar la objetividad sin que la ansiedad dificulte la reflexión, por su confianza en mis capacidades.

A la Dra. Yolanda García Mesa por su disponibilidad atemporal, por ser mi prolongación ejecutiva. Sin su colaboración no sólo este trabajo habría sido más dificultoso, su bondad y su dedicación minimizaron el estrés.

Este trabajo no habría sido posible sin la colaboración de los miembros del Grupo de investigación SINPOS, en especial de Olivia y de Patricia, del Departamento de Morfología y Biología Molecular para procesamiento y cumplimentación del estudio llevado a cabo, con total disponibilidad de sus instalaciones y medios.

A mis padres por soportar los momentos ausentes que obligó mi formación.

GRACIAS



## Índice

Documentos administrativos

Dedicatoria

Agradecimiento

1. Introducción, 21
2. Estado actual del problema, 31
3. Hipótesis y Objetivos, 53
4. Material y Técnicas, 57
5. Resultados, 65
6. Discusión, 81
7. Conclusiones, 91
8. Bibliografía, 93

**Anexo 1** – Curriculum vitae

**Anexo 2** – Artículo derivado de la Tesis Doctoral





# 1. Introducción



## 1. Introducción

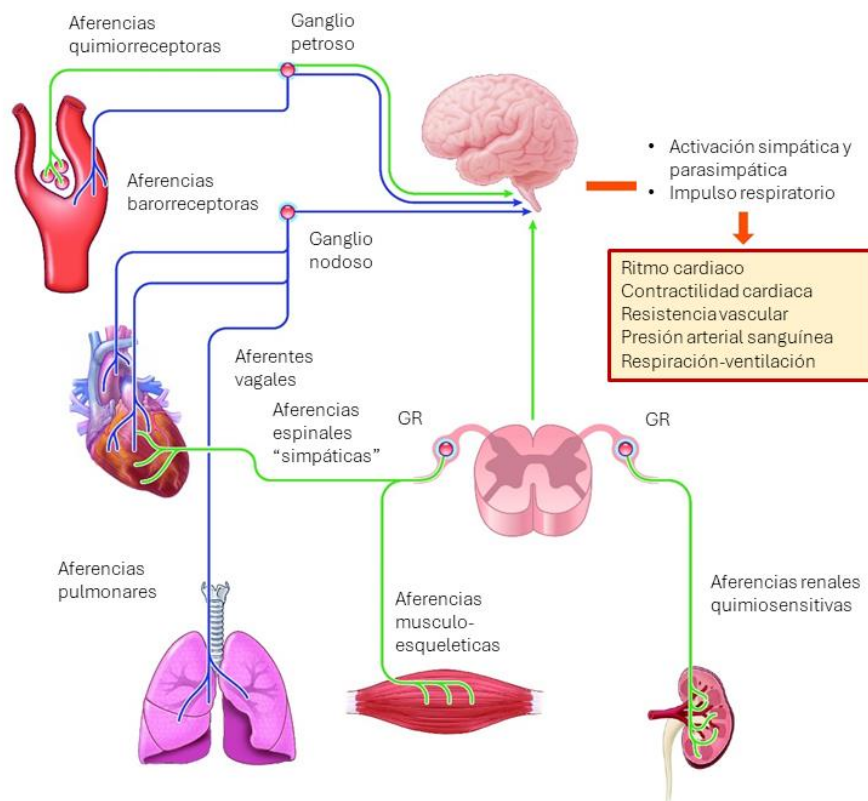
Las neuronas mecanosensoriales, **mecanosensores**, de todos los sistemas fisiológicos detectan la fuerza y los estímulos mecánicos mediante las terminaciones de sus prolongaciones periféricas, de morfologías muy variables, en los diferentes órganos. Los **barorreceptores** arteriales, por su lado, son un subtipo de neuronas mecanosensitivas que monitorizan la presión arterial para estabilizar, en tiempo real, el gasto cardiovascular. Las proyecciones periféricas de los axones de los barorreceptores terminan sobre las paredes arteriales, especialmente el cayado aórtico y el seno carotídeo, formando diferentes tipos de estructuras que detectan los cambios en la presión arterial.

Los barorreceptores proporcionan las señales aferentes a un circuito de retroalimentación negativa en el tronco del encéfalo que mantiene la presión arterial en niveles normales: los receptores se activan cuando la pared del vaso se estira por un aumento de la pared arterial (Kougiyas et al., 2010). Posteriormente, la señal pasa a través del nervio glossofaríngeo al núcleo del fascículo solitario del tronco encefálico. Los axones aferentes primarios hacen sinapsis en el núcleo del fascículo solitario con neuronas que, a su vez, envían proyecciones a diferentes núcleos del tronco del encéfalo. Como resultado final, el tono simpático se reduce y el parasimpático aumenta, lo que finalmente conduce a la vasodilatación con normalización de la presión arterial (Chapleau et al., 2001).

Aunque la totalidad de las paredes vasculares están inervadas, la detección de la presión arterial se produce solo en algunos puntos concretos del sistema vascular. Las aferencias del nervio vago y del nervio glossofaríngeo recogen los estímulos del arco aórtico y el **seno carotídeo**, respectivamente. Las fibras sensitivas vagales acceden a la aorta a través del nervio depresor aórtico, mientras que las del glossofaríngeo llegan al seno carotídeo por el nervio del seno carotídeo. Ambos nervios están formados por fibras co-fasciculantes, que incluyen aferencias mecanosensoriales y quimiosensoriales; este hecho es clave para justificar, en parte, la inclusión del cuerpo carotídeo en un estudio de mecanobiología como el presente. Por tanto, los barorreceptores inervan áreas especializadas de la pared

de los vasos sanguíneos que son más elásticas de lo habitual, debido al adelgazamiento local del músculo liso y a la abundancia de fibras de elastina y colágeno (Rees, 1968; Kirchheim, 1976).

Los pulsos de presión arterial que se producen con cada latido del corazón estiran radialmente la pared del vaso y esta distensión activa los barorreceptores (Kirchheim, 1976; Kimada et al., 1995) que informan sobre la magnitud del estiramiento, la frecuencia del pulso y la presión arterial media. Esta información puede modularse bidireccionalmente, lo que permite una acción refleja adecuada tanto para disminuir como para aumentar la presión arterial. En respuesta a la activación de los barorreceptores, se activan vías neuronales paralelas que disminuyen la actividad simpática y potencian la parasimpática, lo que en última instancia reduce la frecuencia cardíaca y la presión arterial (Spyer, 1989; Andresen y Kunze, 1994).



**Figura 1.1.-** Esquema de las interacciones entre barorreceptores y quimiorreceptores, el sistema vagal cardiovascular, el simpático cardíaco espinal, los propioceptores y los reflejos aferentes renales quimiosensibles. Las vías aferentes en azul y verde son simpático-inhedoras y simpático-excitatorias, respectivamente. Tomado de Iturriaga et al. *Physiol Rev.* 2021.

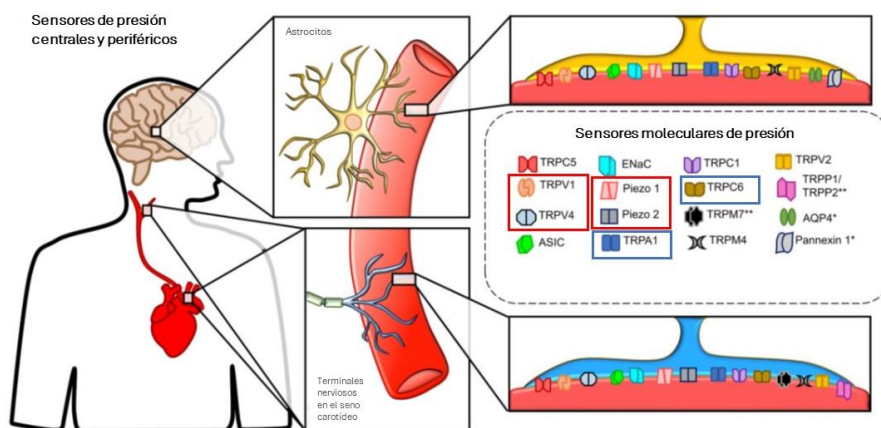
Así, pues, los barorreceptores que inervan las zonas específicas de los vasos antes indicadas proporcionan al sistema nervioso central información esencial y constante para el control de la frecuencia cardíaca, la presión arterial y la respiración. Eso lo que se denomina **reflejo barorreceptor**, en el que la presión arterial elevada desencadena instantáneamente disminuciones compensatorias en el gasto cardiovascular para estabilizar el flujo sanguíneo a todo el cuerpo y, especialmente, al cerebro (Kirchheim, 1976; Brown, 1980; Kumada et al., 1995; Benarroch, 2008; Wehrwein y Joyner, 2013) (**Figura 1.1**).

El reflejo barorreceptor juega un papel clave en la regulación cardiovascular, permitiendo la estabilización de la presión arterial y, por lo tanto, en el mantenimiento de un flujo sanguíneo tisular adecuado. Las preguntas clave en los últimos años han sido cómo funcionan los barorreceptores y cuál es la naturaleza de los receptores sensoriales que monitorizan la presión arterial. El reciente descubrimiento de los canales piezoeléctricos o Piezo (Coste et al., 2010; Coste, 2013; ver Murthy et al. 2017), canales mecanosensibles presentes en una variedad de terminaciones nerviosas, llevó a la hipótesis de que los canales Piezo subyacen a la barosensación.

Hasta muy recientemente se desconocían los mecanismos moleculares de la mecanotransducción en las terminaciones periféricas de los barorreceptores. Es decir, los mecanismos por los cuales un estímulo de presión se transforma en un potencial de acción. Considerando que, en el origen de todos los tipos de sensibilidad, incluidas las diferentes cualidades de la mecánica, se encuentran canales iónicos, cabe pensar que también debe de ser el caso de la barosensibilidad. Entre los canales iónicos candidatos a mecanosensores y/o mecanotransductores se han propuesto a miembros de las familias de canales degenerina-canales epiteliales de sodio (Deg/ENa<sup>+</sup>C), *acid-sensing ion channels* (ASIC; canales iónicos sensibles a ácido), *transient receptor potential* (TRP; canales iónicos de potencial transitorio de membrana), canales de doble poro de potasio y, sobre todo, canales Piezo (**Figura 1.2**).

Existen evidencias al respecto para la subunidad  $\gamma$ -ENa<sup>+</sup>C (Drummond et al., 1998), ASIC2 (Lu et al., 2009), Piezo2 (Chesler et al., 2016), y TRPC5 (Thakore et al., 2018). Sin embargo,

en los animales genéticamente modificados que carecen de estos canales iónicos persiste una sensibilidad residual sustancial de los barorreceptores, lo que implica la participación de otros canales iónicos no identificados. La mayoría de esos los canales iónicos candidatos a mediar la mecanosensibilidad en los barorreceptores no se ha logrado activar directamente por estímulos mecánicos en sistemas heterólogos, por lo que se cree que se trata de moléculas accesorias de un complejo mecanosensorial no completamente conocido. Además, no está claro si estos canales actúan como sensores o desempeñan un papel posterior a la mecanotransducción.



**Figura 1.2.-** Esquema que representa los canales iónicos detectados en las terminaciones periféricas de los barorreceptores aórtico y carotídeo. Tomado de Yang et al. *Cardiovasc Res.* 2022

El panorama cambia radicalmente en el caso de los canales iónicos Piezo. En 2018, Zeng et al. observaron en ratones que la pérdida funcional de los canales PIEZO causa un deterioro de la función barorreceptora, y que los canales PIEZO1 y PIEZO2 juntos, no individualmente, son mecanorreceptores críticos en la función barorrefleja. Es probable que existan otros factores receptores mecánicos o sensoriales además de los canales Piezo, pero como se expondrá más adelante, estos hallazgos cambiaron el concepto molecular de la barorrecepción ya que afectan a la clínica por convertirse en dianas terapéuticas para diferentes patologías. Los resultados de los estudios del grupo de Zeng fueron admitidos con gran expectación por la comunidad científica (Ehmke 2018; Allison 2019; Burke et al. 2019; Miglis y Muppidi 2019) aunque aún persisten dudas sobre el mecanismo intrínseco de la barorrecepción.

Las proteínas PIEZO son partes esenciales de canales catiónicos mecanosensibles críticos para la sensación de la presión arterial y el reflejo barorreceptor (Zeng et al., 2018). Además, son críticos para la sensación normal de tacto, propiocepción y sensación de estiramiento de las vías respiratorias (Nonomura et al., 2017; Ranade et al., 2014; Woo et al., 2015; Cobo et al., 2020). La activación optogenética de las aferencias vagales que contienen PIEZO2 interrumpe la respiración (Chang et al., 2015; Nonomura et al., 2017), ya que PIEZO2 media la sensación de estiramiento de las vías respiratorias subyacente al reflejo inspiratorio de Hering-Breuer (Nonomura et al., 2017), y también disminuye la frecuencia cardíaca y la presión arterial (Zeng et al., 2018) características del reflejo barorreceptor.

En cuanto al **cuerpo carotídeo**, aunque se lo considera principalmente como un **quimiorreceptor** (ver Iturriaga et al., 2021), existen evidencias recientes, aceptadas por la comunidad científica, de que en realidad es un sensor polimodal y es el punto de convergencia entre los mecanismos de regulación homeostática de la presión arterial y de la glucosa en sangre ya que participa en la detección de la glucosa, la regulación metabólica y el control de la actividad nerviosa simpática (Thakkar et al., 2023). Estos órganos sensoriales son activados por la hipoxia arterial de una manera dependiente del pH; también responden a la hipoglucemia, la **temperatura**, las hormonas (angiotensina, leptina) y el **bajo flujo sanguíneo** (Prabhakar, 2013; Nurse, 2014; Zera et al., 2019; Ortega-Saenz y López-Barneo, 2020).

Los quimiorreceptores coordinan los cambios en la presión respiratoria y arterial durante la hipercapnia y las alteraciones crónicas del equilibrio ácido-base. La activación de los cuerpos carotídeos por hipoxia impulsa, a través de los nervios glosofaríngeo y vago, la estimulación del sistema nervioso simpático, que determina un aumento de la presión arterial y, en última instancia, mejora la perfusión cerebral (McBryde et al., 2017).

¿Qué datos existen para sospechar que el cuerpo carotídeo también interviene en la detección de los cambios de la presión arterial?

Se ha demostrado experimentalmente que la hiperactividad del cuerpo carotídeo desencadena hipertensión (Abdala et al., 2012; Riveiro et al., 2013; Del Rio et al., 2016; Pijacka et al., 2016; Shin et al., 2019). En roedores, el barorreflejo arterial se regula a la baja cuando se activan los cuerpos carotídeos (McBryd et al., 2013). Por el contrario, la resección del cuerpo carotídeo produce reducciones sostenidas de la presión arterial (Nakayama et al., 1962; Paton et al., 2013) y su denervación retrasa el desarrollo de hipertensión (Abdala et al., 2012; McBryde et al., 2013). En todos los modelos, la principal evidencia es que la escisión o denervación bilateral del cuerpo carotídeo atenúa la hipertensión.

El quimiorreflejo y el barorreflejo, en conjunto, controlan el sistema cardiovascular a través de las profundas influencias que ejercen sobre el flujo de salida autónomo, y ambas respuestas reflejas son interdependientes, particularmente en presencia de estímulos como la hipoxia o la isquemia (Marshall, 1998). Y aunque todavía existe debate sobre la interdependencia entre estas dos respuestas reflejas, se ha observado que la estimulación eléctrica unilateral del seno carotídeo y del nervio del seno carotídeo activa tanto el barorreflejo como el quimiorreflejo (Gonzalez et al., 1994), lo que resulta en hipotensión (Katayama et al., 2015). Además, también se demostró que la respuesta hipotensora después de la estimulación eléctrica del seno carotídeo se ve potenciada por la desactivación de los quimiorreceptores carotídeos (Katayama et al., 2015), lo que sugiere que un quimiorreflejo bilateral intacto contrarresta los efectos hipotensores de la estimulación del seno carotídeo. En conclusión, la regulación quimiorrefleja y barorrefleja a corto plazo de la presión arterial se disocian en términos de respuesta hipóxica, pero se integran para generar una respuesta efectora a un cambio dado en la presión arterial (Conde et al., 2022).

La segunda evidencia mayor de que el cuerpo carotídeo puede detectar cambios mecánicos se basa en que las neuronas del ganglio petroso y algunas poblaciones celulares glómicas expresan canales iónicos relacionados con la mecanosensibilidad (Iturriaga y Alcayaga, 2004; Hondoh et al., 2010; Shirahata et al., 2015), incluidos los canales Piezo (Chang et al., 2015; Zeng et al., 2018; Min et al., 2019).



En base a los datos anteriormente expuestos se ha planteado el presente trabajo de Tesis Doctoral con el objetivo de detectar proteínas de canales iónicos relacionados con la mecanosensibilidad (presión, flujo, osmolaridad) en el complejo seno carotideo-cuerpo carotídeo. Es de esperar que en el **seno carotídeo** las mecanoproteínas investigadas se detecten en los nervios que lo suplen y que están localizados en sus paredes; en cuanto al **cuerpo carotídeo** también deben de encontrarse en los nervios, pero no se puede descartar *a priori* su presencia en las células glómicas. El trabajo se ha realizado utilizando material humano y técnicas de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia asociada a microscopía laser confocal y de cuantificación. El estudio se enmarca en la línea de investigación iniciada recientemente por el grupo de investigación acreditado SINPOS (Martínez-Barbero, 2023; Martínez-Barbero et al., 2023; ) encaminado a analizar todos los posibles componentes sensitivos de los baro y quimiorreceptores periféricos.



## 2. Estado actual del problema



## 2. Estado actual del problema

En las páginas que siguen se exponen los datos esenciales sobre el seno y el cuerpo carotídeos y su inervación, así como los canales iónicos mecanosensibles incluidos en este trabajo de tesis doctoral.

### 2.1. Estructura, inervación y función del seno carotídeo

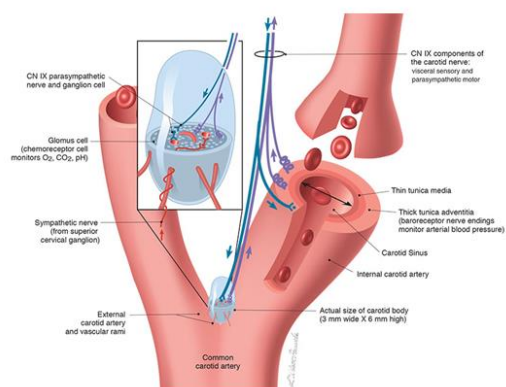
#### 2.1.1. Estructura

El seno carotídeo, o bulbo carotídeo (*sinus caroticum*), es una estructura neurovascular que se presenta como una dilatación distal a la bifurcación de la arteria carótida común, que crea una expansión del calibre y conduce a la perturbación del flujo y la formación de vórtices (Nguyen et al., 2008). Las arterias carótidas están formadas histológicamente de tres capas que de dentro a afuera son la túnica íntima, la túnica media y la túnica adventicia. La túnica íntima, a su vez, consta de un endotelio sostenido por una capa elástica y colágena. La túnica media consiste en una capa de músculo liso relativamente gruesa que se encarga de cambiar el diámetro de los vasos sanguíneos para regular el flujo sanguíneo. Por último, la túnica adventicia, más externa, está hecha de tejido conectivo laxo con abundante colágeno y elastina, y sirve para unir el vaso a los tejidos circundantes. La característica estructural del seno carotídeo es que las paredes están muy adelgazadas, sobre todo a expensas de la capa muscular.

#### 2.1.2. Inervación

La inervación del seno carotídeo la realiza el nervio del seno carotídeo, o nervio de Hering, que es una rama del nervio intercarotídeo del nervio glossofaríngeo, formado por fibras nerviosas de diferentes calibres aferentes y eferentes (fibras simpáticas que se incorporan al nervio glossofaríngeo) (Porzionato et al., 2019; Bryant et al., 2023).

El barorreflejo arterial proporciona un control de la presión arterial latido a latido. Esto se logra, en parte, gracias a un grupo heterogéneo de aferencias barorreceptoras arteriales, es decir de terminaciones nerviosas mecanosensibles, localizadas en los senos carotídeos, cuyos cuerpos celulares localizados en los ganglios petrosos del nervio glossofaríngeo (Ciriello et al., 1994; **Figura 2.1**).



**Figura 2.1.** Representación esquemática de la inervación aferente y eferente del seno y del cuerpo carotídeo. Tomado de Wilson-Pauwels et al. *Cranial Nerves 3rd Edition*. 2010.

Las neuronas barorreceptoras dan origen a una población heterogénea de fibras mielinizadas y no mielinizadas (para revisiones, véase Andresen y Kunze 1994; Kumada et al. 1990; Schild y Kunze, 2012). Los barorreceptores de tipo A están mielinizados y tienen un umbral de potencial de acción más bajo que las fibras C, amielínicas. Las fibras muestran cambios en la frecuencia del potencial de acción que son directamente proporcionales al cambio de la presión arterial en un amplio rango de presiones (Seagard et al., 1990,1993). Esta heterogeneidad en la estructura de las aferencias probablemente permite la codificación de diferentes estímulos de la presión arterial y puede explicar por qué las neuronas del núcleo del fascículo solitario responden selectivamente a distintos tipos de estímulos (Kolpakova et al., 2017). Los distintos tipos de fibras también pueden codificar diferentes dinámicas. Así, hay pruebas que sugieren que las fibras de tipo C y las fibras finas de tipo A pueden codificar niveles absolutos de presión (es decir, de adaptación lenta), mientras que las fibras gruesas de tipo A pueden proporcionar información sobre el cambio de presión agudo (es decir, la adaptación rápida) (Seagard et al., 1990; Rogers et al., 1993,1996).

La estructuras de las terminaciones neuronales en el seno carotídeo ha sido ampliamente estudiadas mediante microscopía óptica y electrónica (Aumonier, 1972; Krauhs, 1979). Sin embargo, los primeros estudios sobre la estructura de los barorreceptores asumieron que el nervio depresor aórtico, al menos en rata, está formado exclusivamente un tipo de terminación por lo que los análisis resultantes concluyeron que los barorreceptores

eran de un tipo único. Trabajos posteriores, en ratas y otras especies, indicaron que las neuronas sensitivas aórticas tienen tres morfologías terminales principales: terminaciones en flor, terminales de la red final y contactos de células glómicas (Cheng et al., 1997). Se ha aceptado que los aferentes cercanos a las células del glomus funcionan como quimiorreceptores, pero no está claro si las terminaciones en flor y las terminaciones reticulares finales son tipos diferentes de barorreceptores o si cumplen funciones sensoriales alternativas. Cada fibra barorreceptora detecta una presión característica (umbral) por debajo de la cual los barorreceptores están inactivos y cuando se produce una subida de presión cada una de ellas se activa y frecuencia del potencial de acción alcanza un máximo. Por lo tanto, el rango de codificación de la población de barorreceptores arteriales individuales generalmente coincide con el rango fisiológico de presiones de 40 a 180 mmHg. Los aumentos en la actividad aferente de los barorreceptores reducen la resistencia periférica total a través de la inhibición de la actividad nerviosa simpática (vasodilatación arteriolar en muchos lechos vasculares) y la reducción del gasto cardíaco (reducción tanto de la frecuencia cardíaca como del volumen sistólico) a través de la disminución de la entrada simpática y el aumento de la entrada parasimpática. La disminución de la activación aferente de los barorreceptores promueve la vasoconstricción y el aumento del gasto cardíaco. Estas respuestas reflejas iniciadas por los barorreceptores carotídeos y aórticos son rápidas, y se adaptan casi instantáneamente a los cambios en la presión arterial.

### 2.1.3. Función

La función del seno carotídeo empezó a intuirse en 1875, cuando Quincke observó la asociación entre la compresión de la bifurcación carotídea y la disminución del gasto cardíaco (Munster et al., 2016), hecho que se atribuyó a la compresión de los nervios adyacentes a la carótida (Persson y Kirchheim, 1991). Pero a principios de la década de los años 20 del siglo pasado, Heinrich E. Hering demostró la anatomía y la función del seno carotídeo y su nervio tal y como se entiende en la actualidad. Observó que la aplicación directa de un estímulo de presión interno en el seno carotídeo tenía efectos similares a los de la estimulación eléctrica directa del seno, y apreció que el nervio que suplía la zona no era rama del vago, sino del glosofaríngeo (ver Persson y Kirchheim, 1991; Zimmer, 2004).

En la actualidad, se conoce perfectamente que el seno carotídeo es un **sensor de presión** o **barorreceptor** (Andani y Khan, 2020). Se acepta que es una dilatación arterial, pero las características geométricas del mismo conducen a la perturbación del flujo y la formación de vórtices (Nguyen et al., 2008). Estas propiedades, junto con el ciclo cardíaco, conducen a una distensión pulsátil del carotídeo con cada pico de presión sistólica en cada latido; en otras palabras, el seno carotídeo, debido a la geometría de la dilatación, experimenta un campo de tensión no uniforme con flujo pulsátil (Bilgi y Atalik, 2020). Los tipos de fuerzas que actúan sobre el endotelio vascular se consideran, en términos generales, como un estiramiento circunferencial (Lu y Kassab, 2011), que refleja la presión arterial y depende de las propiedades del fluido y de las condiciones de flujo, y se ve muy afectado por la viscosidad (Lee et al., 2020).

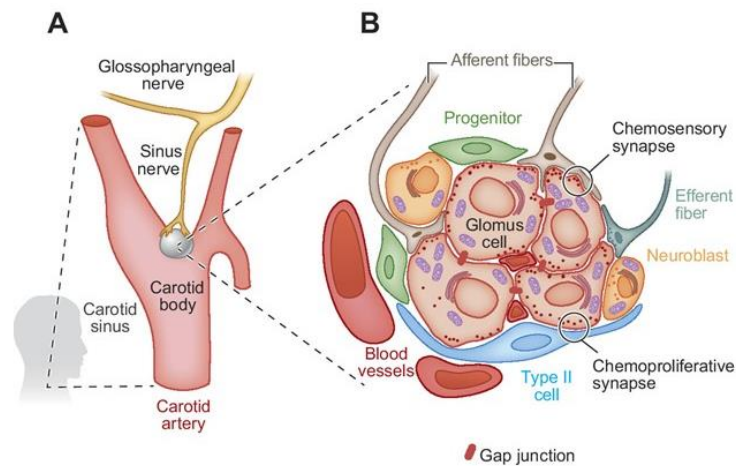
Además de la presión, el seno carotídeo también ha sido implicado en la detección de la **viscosidad** de la sangre. Durante los últimos 30 años, las simulaciones computacionales de dinámica del flujo sanguíneo en el seno carotídeo han permitido medir en tiempo real la viscosidad de la sangre (Iskander et al., 2021). Pero aún se desconoce si el seno carotídeo funciona o no como viscosensor.

## 2.2. Estructura, inervación y función del cuerpo carotídeo

### 2.2.1. Estructura

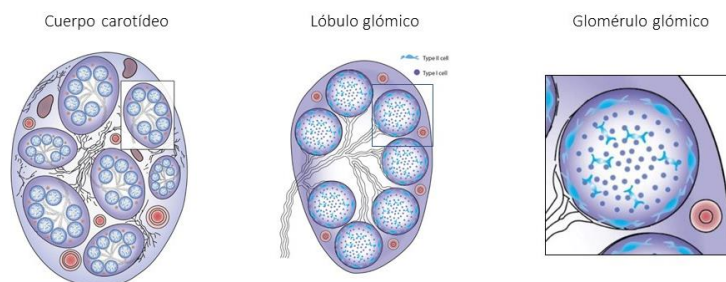
El cuerpo carotídeo es un órgano par, localizado en el ángulo de la bifurcación de la arteria carótida común. Mide unos 2-3 mm y pesa 18-20 mg (Iturriaga y Alcayaga, 2004; Ortega-Sáenz et al., 2013). A pesar de su reducido tamaño, el cuerpo carotídeo tiene el flujo sanguíneo más alto (1.0-2.0 L / min / 100 g) de todo el organismo (Barnett et al., 1988) que aportado por ramas de las arterias carótidas y que en el interior del órgano forman una densa red vascular de pequeñas arterias, capilares fenestrados y vénulas (Figura 2.2).





**Figura 2.2. Esquemas de la localización y estructura del cuerpo carotídeo.** A: bifurcación carotídea y localización del cuerpo carotídeo. B: representación esquemática de un glomérulo del cuerpo carotídeo. Se señalan las sinapsis quimiosensoriales y quimioproliferativas. Tomado de Ortega-Sáenz y López-Barneo, *Annu Rev Physiol.* 2020.

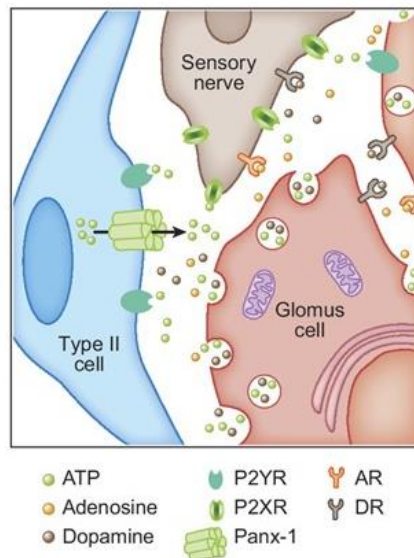
El cuerpo carotídeo lo forman un número variable de **lóbulos glómicos** rodeados por una densa cápsula de tejido conectivo que contiene vasos y nervios; a su vez, cada lóbulo lo constituyen varios glomoides o **glomérulos glómicos**, considerados como la unidad estructural (**Figura 2.3**). Los glomérulos están formados por dos tipos de células, además de los vasos y los nervios. Las **células tipo I**, células glómicas o células quimiorreceptoras, se organizan alrededor de los capilares, y las células **células tipo II**, gliales o sustentaculares, que se disponen por fuera de las de tipo I (**Figura 2.2**).



**Figura 2.2.** Estructura básica del cuerpo carotídeo. Tomado de Gold et al. *Front Synaptic Neurosci.* 2022.

Dentro del cuerpo carotídeo ambos tipos de células glómicas mantienen importantes y complejas relaciones estructurales y funcionales entre ellas (**Figura 1.3**). Nurse et al. (2014, 2018) observaron que la hipoxia induce la liberación de ATP a través de canales de pannexina-1 en las células tipo II, contribuyendo a la integración sináptica y la comunicación cruzada entre las células tipo I, las células tipo II y las terminaciones

nerviosas; a este complejo sistema de relación lo denominaron **sinapsis tripartita**. Las células de tipo II, por su lado, expresan receptores purinérgicos P2Y2 y canales de pannexina permeables al ATP, así como receptores muscarínicos y de angiotensina tipo 1 (AT1) (Frinchi et al., 2013; Nurse, 2014; Murali et al., 2016; Nurse et al., 2018; Taruno et al., 2018) (Figura 2.3).



**Figura 2.3.** Representación esquemática de la **sinapsis tripartita**. AR: receptor de adenosina; DR: receptor de dopamina; Panx-1, canal pannexina-1; P2XR: receptor ionotrópico purinérgico 2X; P2YR: receptor metabotrópico purinérgico 2Y. Tomado de Ortega-Sáenz y López-Barneo, *Annu Rev Physiol.* 2020.

Aunque no es una cuestión que se aborde en este trabajo, es necesario hacer una breve consideración sobre el nicho neurogénico del cuerpo carotídeo. Una serie de elegantes experimentos realizados por el grupo de investigación de López-Barneo demostraron que el cuerpo carotídeo es un nicho neurogénico que contiene una población de células troncales multipotentes derivadas de la cresta neural. En condiciones de normoxia son células quiescentes, pero en situaciones de hipoxia mantenida proliferan y se diferencian a células tipo II, las cuales pierden su fenotipo y se transforman en células tipo I (Pardal et al., 2007; Platero-Luengo et al., 2014; López-Barneo, 2018; Ortega-Sáenz y López-Barneo, 2020). De todas formas, las células troncales del cuerpo carotídeo no son activadas directamente por la hipoxia, y su activación depende de las células tipo I. El término **sinapsis quimioproliferativa** fue propuesto por López-Barneo para designar los contactos funcionales que se establecen entre las células tipo I y las células troncales y

que, en gran medida, son los responsables de los procesos de diferenciación de estas (Figura 2.1).

### 2.2.2. Inervación

Las células tipo I del cuerpo carotídeo establecen contactos sinápticos con los terminales nerviosos de las neuronas aferentes primarias, cuyos somas se localizan en el ganglio petroso del nervio glossofaríngeo (Iturriaga y Alcayaga, 2004; Kumar y Prabhakar, 2012; López-Barneo et al., 2016).

Por su lado, los vasos sanguíneos y las células tipo I, reciben inervación simpática del ganglio cervical superior a través de los nervios ganglio-glomerulares; también se han localizado neuronas postganglionares simpáticas dentro del cuerpo carotídeo y en el propio trayecto del nervio glossofaríngeo (McDonald y Mitchell, 1975) (Figura 2.1).

### 2.1.3. Función

Los quimiorreceptores periféricos, especialmente el **cuerpo carotídeo**, son sensores capaces de detectar cambios en los niveles sanguíneos de oxígeno (hipoxemia), dióxido de carbono (hipercapnia), pH (acidosis) y glucosa (hipoglucemia) (Iturriaga et al., 2021). La activación de quimiorreceptores en las células de tipo I lleva a su despolarización y a un aumento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ , la liberación de múltiples neurotransmisores y la activación sináptica de las terminaciones nerviosas aferentes (Eyzaguirre y Fidone, 1980; Nurse, 2005; Lu et al., 2013; Porzionato et al., 2019).

En la actualidad, se acepta que el cuerpo carotídeo es un sensor multimodal. Varios estudios sugieren que, además de detectar las variaciones en el oxígeno, dióxido de carbono y pH, también es sensible a niveles bajos de glucosa y/o participa en la regulación del metabolismo (Koyama et al., 2000; Pardal y López-Barneo, 2002; Zhang et al., 2007; Wehrwein et al., 2010; Shin et al., 2014). Hasta donde nosotros conocemos no existen datos directos sobre su implicación en funciones de mecanodetección.

## 2.3. Canales iónicos mecanosensibles

### 2.3.1. Introducción

Los organismos vivos han desarrollado a lo largo de la evolución sistemas sensores para relacionarse con el medio ambiente y recibir señales del interior del propio cuerpo. En la actualidad se acepta que todos los tipos de sensibilidad están relacionados con y dependen de **canales iónicos** (Belmonte y Viana, 2008; Martín-Alguacil et al., 2022). Los canales iónicos son estructuras de la membrana celular formados por agregados de proteínas que contienen un poro central acuoso para el intercambio iónico entre la célula y el medio externo. Todos comparten tres características: conducen iones, reconocen y seleccionan iones específicos y se abren o cierran en respuesta a señales eléctricas, mecánicas o químicas. De acuerdo con su mecanismo de activación pueden diferenciarse diferentes tipos de canales de membrana: los que no se pueden abrir o cerrar y los que sí lo hacen y son dependientes de ligando (ionotrópicos), dependientes de protones, controlados por segundos mensajeros (metabotrópicos) y dependientes de voltaje.

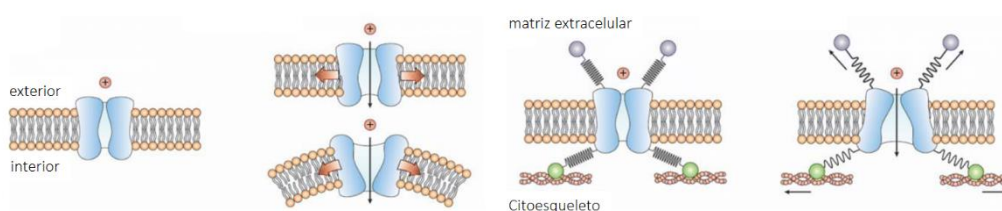
La trascendencia de los estudios sobre la identificación de los canales iónicos que participan o son responsables directos de las distintas modalidades sensoriales se plasmó en la concesión del Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 2021 a David Julius y Ardem Patapoutian (ver Reeh y Fischer, 2022).

### 2.3.2. Canales iónicos mecanosensibles

La activa investigación en el campo de la mecanobiología que se viene llevando a cabo en la última década, ha permitido identificar proteínas esenciales para la mecanotransducción y otras que pueden ser requeridas para algunos pasos de esta. La mayoría de ellas están relacionadas con los canales iónicos (Martinac y Poole, 2018; Douguet y Honore, 2019; Kefauver et al., 2020; Jin et al., 2020).

Para explicar el mecanismo de la mecanotransducción (es decir, la conversión de un estímulo mecánico en un efecto eléctrico, químico o biológico) se han propuesto canales iónicos dependientes e independientes de voltaje. Es importante subrayar que el efecto de una fuerza sobre una célula depende del sitio de incidencia sobre la membrana. Las membranas celulares contienen "corrales de proteínas" (dominios espaciales de

proteínas lipídicas) y la incidencia de fuerzas dentro estos dominios son diferentes que en la membrana circundante. Por lo tanto, los canales iónicos mecanosensibles pueden cerrarse o no por inclusión o exclusión de un dominio (Sukharev y Sachs, 2012). Existen dos tipo básicos de canales mecanosensibles: los que se abren-cierran por la tensión-deformación de las proteínas de la membrana celular (Moe y Blount, 2005; Martinac, 2014) y los que abren-cierran por la tensión de las proteínas estructurales unidas a ellos (es decir, de la matriz extracelular y del citoesqueleto; Meng y Sachs., 2011; Suchyna et al., 2007,2009,2011; Huang et al., 2013; Martinac, 2014) (**Figura 2.4**).



**Figura 2.4.**- Tipos básicos de canales mecanosensitivos. Modificado de Ridone et al. *Biophys Rev.* 2019.

Según Delmas y Coste (2013), los canales iónicos mecanosensibles se pueden dividir en dos categorías: los que responden a la tensión de la membrana y los que son susceptibles de estiramiento. La experimentación propone, al menos, tres mecanismos capaces de activarlos: 1) modificaciones de la membrana celular en las proximidades de los canales; 2) tensión de la matriz extracelular y/o proteínas citoesqueléticas ancladas a los dominios extra o intracitoplasmáticos, respectivamente, de los canales iónicos de membrana; 3) acoplamiento de proteínas mecanosensoriales secundarias a los canales iónicos (Lumpkin y Caterina, 2007; Sharif-Naeini, 2015). Por lo tanto, cualquiera de estos tres mecanismos, o una combinación de ellos, está en la base de la apertura del canal iónico mecanosensible y, en consecuencia, de la mecanodetección y /o mecanotransducción.

La identidad de los canales mecanosensibles es muy variada, y pertenecen a varias familias y superfamilias de canales iónicos. Las superfamilia **degenerina/canales epiteliales de sodio** (DEG/ENa<sup>+</sup>C), **potencial de receptor transitorio** (TRP), **dominio de dos poros de potasio** (K<sub>2p</sub>) y la familia **Piezo**, tienen miembros que han demostrado ser canales iónicos mecanosensoriales y/o mecanotransductores total o parcialmente (ver Coste y

Delmas, 2013; Gu y Gu, 2014; Ranade et al., 2015; Sharif-Naeini, 2015; Cobo et al., 2020). Sin embargo, solo PIEZO1 y PIEZO2 ha demostrado propiedades mecanotransductoras en vertebrados. Por lo tanto, el resto de las supuestas mecanoproteínas podrían ser proteínas accesorias y no una parte esencial del canal o canales iónicos mecanosensibles adecuados.

En los párrafos siguientes se realiza una puesta al día sobre las proteínas analizadas en este trabajo de tesis doctoral. Respecto a la superfamilia DEG/ENaEC y ASIC, existen evidencias de que los miembros de la familia de canales iónicos sensibles a ácido (ASIC) puede funcionar como mecanorreceptores. Esta familia ha sido objeto de un trabajo reciente de tesis doctoral realizado en nuestro laboratorio (Martínez-Barbero, 2023; Martínez-Barbero et al., 2023) y por ello no se ha abordado su estudio en la presente tesis doctoral.

#### 2.3.2.1. Canales iónicos mecanosensibles de las familias TRP

Las proteínas de los canales iónicos TRP son proteínas de transmembrana que forman parte de canales catiónicos no selectivos, aunque unos pocos son altamente selectivos para el  $\text{Ca}^{2+}$  y algunos son permeables para el  $\text{Mg}^{2+}$ . La superfamilia de canales TRP se subdivide en 7 familias: TPRC (canónica), TRPV (vanilloide), TRPM (melastatina), TRPP (policistina), TRPML (mucolipina), TRPA (ankirina), y TRPN (NOMPC-like); la última se ha detectado sólo en invertebrados y peces. En mamíferos se han identificado al menos 28 proteínas TRP diferentes.

Estructuralmente, una proteína TRP típica contiene 6 dominios transmembrana (S1 a S6) con un bucle reentrante formador de poro entre S5 y S6 (Clapham et al., 2005; Hellmich y Gaudet, 2014; Nilius y Szallasi, 2014; Samanta et al., 2018). Funcionalmente, se han relacionado con todos los tipos de sensibilidad (véase revisión Eid y Cortright, 2009; Nilius y Owsianik, 2011; Nilius y Szallasi, 2014).

En la superfamilia de canales iónicos TRP algunos de sus miembros intervienen en la transducción de estímulos osmóticos y mecánicos. Estos "osmo- y mecano-TRPs" incluyen a **TRPV1**, TRPV2, **TRPV4**, TRPC1, TRPC3, **TRPC6**, **TRPA1**, TRPP2, TRPM3, TRPM4,

TRPM7 y TPML3 (Liedtke y Kim, 2005; Liedtke, 2007; Moore y Liedtke, 2017). En nuestro trabajo se han estudiado los canales TRPV1, TRPV4, TRPC6 y TRPA1. Los dos últimos resultaron negativos, por lo que el estudio se circunscribió a TRPV1 y TRPV4. Además, se ha incluido en el presente trabajo, el canal **TRPM8**, ya que existen algunas evidencias de que pueda tener también una función mecanosensorial.

Sin embargo, como ya se ha reiterado a lo largo de las páginas precedentes, no se ha establecido completamente si esos canales iónicos TRP son mecanosensores o solo son necesarios para la mecanosensación. Recientemente, se demostró que los miembros de diferentes familias de canales TRP son insensibles al estiramiento de la membrana, lo que sugiere que no son mecanotransductores primarios. A pesar de esto, se está acumulando evidencia de que algunos miembros de las familias del TRP participan en la mecanodetección.

#### 2.3.2.1.1. TRPV1

Los canales TRPV1 responden a la hipertonicidad y a señales térmicas en las proximidades de los 37°C (Zaelzer et al., 2015). Un estudio reciente de Yan et al. (2021) ha demostrado en preparaciones del nervio del arco aórtico que tanto TRPV1 como ASIC2 son funcionalmente necesarios, ya que el bloqueo de cualquiera de ellos anula casi completamente la descarga nerviosa dependiente de la presión. ASIC2 y TRPV1 se co-localizan en las terminaciones nerviosas aórticas y funcionan sinérgicamente en la transducción mecanoeléctrica de los barorreceptores arteriales, pero no está claro si funcionan de forma independiente o en coordinación.

#### 2.3.2.1.2. TRPV4

TRPV4 es un canal catiónico no selectivo de iones de calcio, magnesio y sodio que se activa en respuesta a factores bioquímicos y mecánicos en muchos tipos de células, incluidas las células endoteliales (Becker et al., 2009; Toft-Bertelsen y MacAulay, 2021).

En el año 2000 Liedtke et al. demostraron que TRPV4 es osmosensor y/o mecanorreceptor de estiramiento, y existen abundantes estudios que sugieren, inequívocamente, que TRPV4 está involucrado de manera crítica y estrecha en la

mecanotransducción (Liedtke y Friedman, 2003; Loukin et al., 2009; Thodeti et al., 2009; Matthews et al., 2010; Adapala et al., 2013, 2016, 2020, 2021; Rahaman et al. 2014). TRPV4 es un componente clave de osmosensibilidad en los reflejos de las vías respiratorias; los activadores de TRPV4 y las soluciones hipoosmóticas producen la despolarización de las neuronas sensitivas vagales y esta acción es inhibida por los antagonistas de TRPV4 (Bonvini et al., 2016).

TRPV4 se expresa en las neuronas de los ganglios raquídeos (Liedtke et al., 2000; Liedtke y Friedman, 2003; Chen et al., 2014, 2013), nervios periféricos y corpúsculos de Meissner, y en queratinocitos (Delany et al., 2001; Güler et al., 2002, Alonso-Gonzalez et al., 2017). También se expresa en condrocitos del cartílago articular donde responde a señales osmóticas (Phan et al., 2009) y juega un papel central en la transducción de señales mecánicas para apoyar el mantenimiento de la matriz extracelular del cartílago y la salud de las articulaciones. En el ojo de los vertebrados, TRPV4 está implicado en la detección mecánica de la presión intraocular y su regulación (Ryskamp et al., 2016). TRPV4 también se expresa en las paredes de los vasos sanguíneos (Jawaid et al., 2022).

Igualmente se ha observado que TRPV4 desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis osmótica celular mediante el cambio de volumen regulatorio, es decir, la disminución del volumen regulatorio en respuesta a la hipotonicidad y el aumento del volumen regulatorio en respuesta a la hipertonicidad (Arniges et al., 2004).

#### 2.3.2.1.3. TRPM8

TRPM8 es preferentemente es un sensor de frío activado por temperaturas bajas (>10, <28 °C), pero funciona como un canal iónico polimodal, estimulado por voltaje, compuestos refrigerantes (mentol, icilina), presión e hiperosmolaridad (ver Izquierdo et al., 2021). Se expresa en una subpoblación de neuronas sensitivas primarias (Dhaka et al., 2008) que inervan tejidos altamente sensibles al frío, como la piel, el epitelio de la cavidad oral, los dientes, la mucosa nasal, la lengua y la córnea (Abe et al., 2005; Parra et al, 2010; El Karim et al., 2011; Keh et al., 2011; Tawaza et al., 2017). También se ha detectado en algunas neuronas del ganglio petroso (ver más adelante).



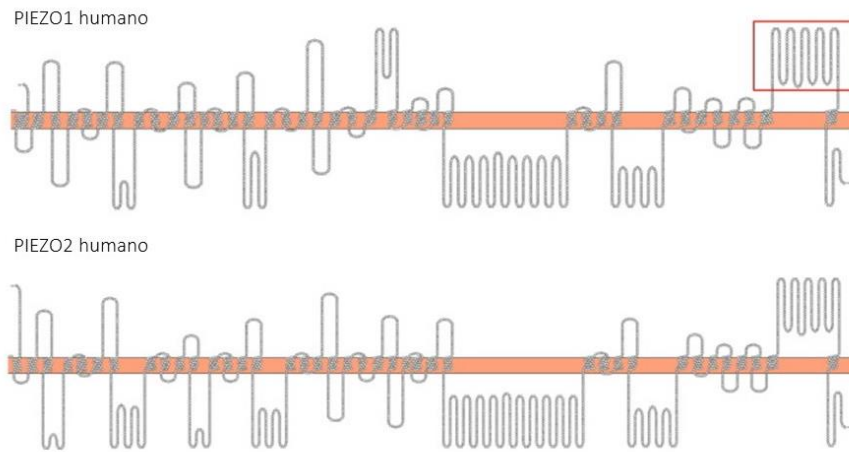
### 2.3.2.2. Canales iónicos mecanosensibles de la familia Piezo

PIEZO1 y PIEZO2 forman una clase única de una familia de canales catiónicos no selectivos, conservada filogenéticamente, que se activan por estímulos físicos, incluyendo presión, estiramiento y cizalladura (Delmas y Coste, 2013; Ranade et al., 2014). Ambos canales generan corrientes de inactivación rápida que convierten la fuerza en respuestas celulares en una escala de tiempo de milisegundos. Las proteínas PIEZO forman de parte de canales iónicos que se comportan como mecanosensibles y mecanotransductores no solo en el sistema nervioso si no también en múltiples sistemas biológicos (Coste et al., 2010; Murthy et al., 2017; Wu et al., 2017; Jiang et al., 2021; Delmas et al., 2022; Young et al., 2022).

Los canales iónicos de la familia PIEZO son los de mayor tamaño identificados hasta la fecha; sus homólogos y ortólogos se encuentran en plantas, eucariotas unicelulares e invertebrados. Los canales Piezo son catiónicos no selectivos, y en humanos están formados por 2521 y 2752 aminoácidos para Piezo1 y Piezo2, respectivamente, con una identidad del 42 % (Honore et al., 2015). Recientemente se han aclarado la estructura y propiedades de sensibilidad mecánica de Piezo1 (Zhao et al., 2018) y Piezo2 (Taberner et al., 2019; Wang et al., 2019). Piezo1 está formado por tres subunidades con 16-18 hélices de transmembrana mientras que Piezo2 es una proteína de con 17-19 hélices transmembrana. Funcionalmente, Piezo1 es un sensor más polimodal para las fuerzas mecánicas que detectan un mayor número de estímulos, mientras que Piezo2 está más adaptado para detectar específicamente el tacto mecánico (Bagriantsev y Gracheva, 2014; Wu et al., 2017; **Figura 2.5**).

Por lo que respecta a su expresión, mientras que PIEZO1 lo hace ampliamente en tejidos no neuronales expuestos a la presión y el flujo de líquidos, por ejemplo, riñones, vejiga, células endoteliales y células sanguíneas, PIEZO2 se expresa predominantemente en tejidos sensitivos, como ganglios raquídeos, ganglio del trigémino y células de Merkel o los axones de los corpúsculos sensitivos cutáneos (Murthy et al., 2017; Wu et al., 2017; Cobo et al., 2020). Es interesante destacar que las **proteínas PIEZO** se coexpresan en los

ganglios nodoso y **petroso**, y están involucrados en el reflejo barorreceptor (Zeng et al., 2018; Min et al., 2019).



**Figura 2.5.-** Estructura de los canales mecanosensitivos Piezo1 y Piezo2 humanos. Modificado de Soattin et al. *Biophys Chem.* 2016.

Por lo que se refiere a su fisiología, las proteínas PIEZO intervienen en la detección táctil, así como en otros procesos biológicos asociados a la mecánica, entre los que se encuentran el desarrollo, migración, proliferación y el alargamiento celulares (Bagriantsev et al., 2014; Wu et al., 2017). En estos tejidos se sospecha que, al menos Piezo1, participan en procesos biológicos asociados a la mecánica, como la detección de la tensión por cizallamiento en los vasos sanguíneos, la regulación del flujo de orina y la distensión vesical, el desarrollo celular, el volumen migración celular, proliferación y elongación.

Recientemente se ha descubierto otro canal iónico mecanosensible denominado tentonina o TTN3/TMEM150C que puede ser activado por estímulos mecánicos en sistemas heterólogos (Hong et al., 2016). TTN3 tiene inactivación lenta y, por lo tanto, se clasifica como un canal ME de adaptación lenta (SA). Está presente en las neuronas de los ganglios raquídeos y en la fibras aferentes de los husos neuromusculares, así como en las neuronas de y en los terminales nerviosos aferentes, barorreceptores, del arco aórtico (Lu et al., 2020). En las neuronas sensitivas primarias, los canales TTN3 median corrientes internas de adaptación lenta en respuesta a la estimulación mecánica, en contraste con

lo que sucede PIEZO2, que media corrientes internas de adaptación rápida. Sin embargo, en su estudio Lu et al. (2020) observaron que la estimulación mecánica de los terminales nerviosos aferentes del arco aórtico produce tres tipos de tipos de corrientes internas en el ganglio nodoso: corrientes de adaptación rápida, corrientes de adaptación intermedia y corrientes de adaptación intermedia. Por tanto, TTN3 podría estar implicada en procesos mecanosensoriales desconocidos incluidos los mediados por los mecanorreceptores de bajo umbral. Por otro lado, TTN3 parecen estar relacionada funcionalmente con PIEZO1 (Dubin et al., 2017), como con PIEZO2 (Parpaite et al., 2021). Por todo ello, Gu y Berkowitz (2020) se plantean si TTN3 es redundante con otros canales mecánicos previamente implicados en la barorrecepción como ASIC2, ENa<sup>+</sup>C, TRPC5 y los canales PIEZO.

### 2.3.3. Canales iónicos mecanosensibles en el seno y cuerpo carotídeos

Como se expuso en las páginas precedentes existe una amplia variedad de canales iónicos activados por estímulos mecánicos. Pero determinar qué canal(es)/procesos celulares son críticos para los barorreflejos centrales y periféricos aún no se ha aclarado definitivamente.

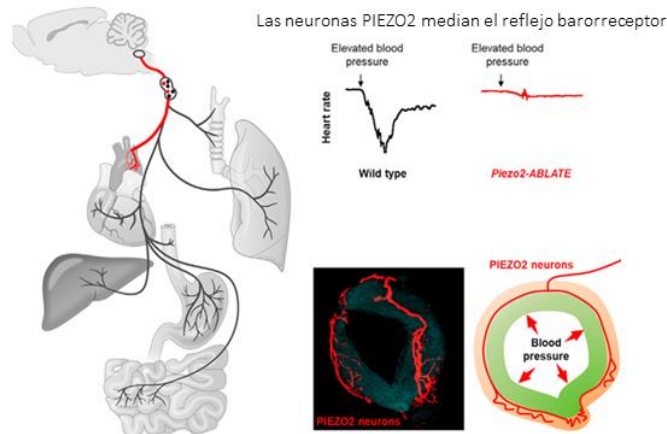
Para ayudar a identificar los mecanosensores moleculares clave involucrados en los barorreflejos periféricos y centrales, hay que tener en consideración que la molécula candidata debe cumplir dos criterios: tener propiedades conocidas de mecanotransducción y expresarse en los nervios aferentes que inervan el arco aórtico y/o el seno carotídeo. Algunos miembros de las superfamilias de canales degenerarina-ENa<sup>+</sup>C, ASIC, TRP y PIEZO cumplen total o parcialmente estos criterios.

#### 2.3.3.1. Seno carotídeo

La base celular de la mecanobiología del seno carotídeo incluye contacto celular directo con fuerzas de cizallamiento, cambios en el voltaje transmembrana y el estiramiento mecánico. Entre los fenómenos físicos que sirven como desencadenantes de la mecanotransducción en las células endoteliales, el más importante es el flujo cortante, definido como la fuerza creada cuando dos campos adyacentes de fluido viajan adyacentes entre sí a diferentes velocidades.

En los vertebrados, PIEZO1 está implicado en la función y el desarrollo endotelial así como la homeostasis cardiovascular (Li et al., 2014; Rode et al., 2017). PIEZO2, por su lado, actúa juntamente con PIEZO1 en el seno carotídeo (Zeng et al., 2018). Recientemente se ha demostrado un cuadro similar al síndrome de "fallo barorreceptor" en ratones *knock-out* para ambos PIEZOs. Sin embargo, la eliminación génica aislada de Piezo1 o Piezo2 no afecta significativamente a la función barorrefleja. Además, los transcritos de Piezo1 y Piezo2 se expresan en los ganglios nodoso y petroso que es donde se encuentran los cuerpos celulares barorreceptores (Chang et al., 2015; Zeng et al., 2018). Estos datos sugieren que las proteínas PIEZO pueden desempeñar un papel fisiológico en el mantenimiento de la función barorreceptora y, en consecuencia, en la regulación de los cambios a corto plazo en la presión arterial. Es posible que PIEZO1 y PIEZO2 sean dos tipos diferentes de aferencias barorreceptoras que muestran diferencias sutiles en las propiedades de respuesta, como el umbral de respuesta, la cinética de respuesta o la tasa de adaptación. Esta hipótesis están en consonancia con los estudios electrofisiológicos que han demostrado la existencia de neuronas barorreceptoras con diferentes propiedades de respuesta y velocidades de conducción (Fidone y Sato, 1969; Kumada et al., 1990).

En el mismo orden de cosas, un trabajo muy detallado de Min et al. (2019) ha demostrado que la ablación de PIEZO2 de las neuronas vagales y del glossofaríngeo elimina los efectos del reflejo barorreceptor y del nervio depresor aórtico sobre la presión arterial y la frecuencia cardíaca. El mapeo genético revela que las neuronas PIEZO2 forman una estructura mecanosensorial distintiva: "garras macroscópicas" que rodean el arco aórtico y emiten finas terminaciones terminales. Otras neuronas que también inervan las paredes arteriales y forman terminales en "ramos de flor" no participan en la barorrecepción (**Figura 2.6**). En conjunto, estos hallazgos proporcionan información estructural sobre cómo se detecta la presión arterial en la pared del seno aórtico, pero no informar sobre el seno carotídeo.



**Figura 2.6.-** Esquema de disposición de los terminales nerviosos PIEZO2 positivos en las paredes del arco aórtico de rata. Modificado de Min et al. *Cell Rep.* 2019.

Además de lo apuntado, los canales Piezo desempeñan un importante papel mecanosensorial en el sistema cardiovascular. Wang et al. (2016) realizaron el descubrimiento seminal al demostrar que Piezo1 es un componente necesario del complejo mecanosensible en las células endoteliales involucradas en la regulación del tono vascular y la presión arterial al iniciar la liberación endotelial de ATP en respuesta al estrés producido por la sangre.

A pesar de las evidencias señaladas y si bien los canales Piezo son los mejores candidatos a mecanosensores en el seno carotídeo, su expresión en el seno carotídeo es baja y por ello se ha propuesto que los canales Piezo se limitan a desempeñar un papel accesorio para el funcionamiento de otros canales (Stocker et al., 2019).

Para los fines de este trabajo es importante destacar que PIEZO1 se expresa de manera prominente en el sistema cardiovascular (Retailleau et al., 2015; Wang et al., 2016), y PIEZO2 es abundante en varias poblaciones de neuronas sensoriales, incluidas las del ganglio petroso (Ranade et al., 2014; Woo et al., 2015; Nonomura et al., 2017).

### 2.3.3.2. Cuerpo carotídeo

Hasta donde conocemos no se ha demostrado la presencia de proteínas PIEZO en el cuerpo carotídeo. Sin embargo, tanto PIEZO1 como PIEZO2 se expresan en las neuronas

sensitivas primarias del ganglio petroso (Chang et al., 2015; Zeng et al., 2018; Min et al., 2019).

Por otro lado, aunque aún no se ha establecido su relevancia para la generación de actividad quimiosensorial del cuerpo carotídeo (Kim et al., 2015), algunos canales iónicos de la familia TRPC canónica (TRPC), han sido detectados tanto las células glómicas de tipo I (TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5, TRPC6 y TRPC7) como en las neuronas del ganglio petroso (TRPC3, TRPC4, TRPC5, TRPC6 y TRPC7 (Buniel et al., 2003; Shirahata et al., 2015; Gao et al., 2017). Y algunos de ellos, especialmente TRPC6 tiene propiedades mecanosensibles.

Además, mediante hibridación *in situ* se ha observado que las neuronas del ganglio petroso expresan canales de la familia de la melastina (TRPCM): TRPM3, TRPM6, TRPM7, TRPM8; de la familia anquirina (TRPA): TRPA1; y vanilloide (TRPV): TRPV1 (Hondoh et al., 2010; Sato et al., 2013; Shirahata et al., 2015; Hossain et al., 2018). También se han descrito transcritos de TRPM3, TRPM4, TRPM6 y TRPM7 en el cuerpo carotídeo (Hondoh et al., 2010; Shirahata et al., 2015).

De todo lo expuesto en las páginas de este capítulo, se extraen varias conclusiones que dejan numerosos interrogantes:

- 1) que no existen datos en sobre la presencia de proteínas potencialmente mecanosensibles ni en las paredes del seno carotídeo humano ni en los barorreceptores que lo inervan;
- 2) que los datos experimentales disponibles se centran en el seno aórtico y no existen referencias ni al seno carotídeo ni al cuerpo carotídeo;
- 3) que no se ha explorado la presencia de proteínas mecanosensoras en el cuerpo carotídeo, aunque algunas con potencial mecanosensibilidad se han detectado en las células glómicas;

4) que en las neuronas sensitivas del ganglio petroso (que prestan inervación aferente tanto al cuerpo como al seno carotídeos) se expresan numerosas proteínas mecanosensibles y se puede hipotetizar que también lo hagan en sus extremos terminales aferentes.

Este trabajo de tesis doctoral se diseñó inicialmente para estudiar fundamentalmente la mecanosensibilidad de los vasos arteriales cerebrales. Sin embargo, la dificultad en la obtención de material en condiciones idóneas hizo que se limitara el estudio a la región de origen de la arteria carótida interna. Pero en última instancia, son el seno y el cuerpo carotídeos los que regular la circulación cerebral.





# 3. Hipótesis y objetivos



## Hipótesis

Los canales iónicos mecanosensibles de la familia PIEZO (PIEZO1 y PIEZO2), y algunos miembros de superfamilia TRP (transient receptor potential channels) con capacidad de detectar estímulos mecánicos (TRPA1, TRPC6, TRPM8, TRPV1 y TRPV4) intervienen en detección de las variaciones de la presión arterial, tanto en el seno como en el cuerpo carotídeo y, por tanto, deben de expresarse en las células de esos órganos y/o en los nervios que los suplen.

## Objetivos

El **objetivo general** es contribuir a conocimiento de los mecanismos por los cuales el seno y el cuerpo carotídeos humanos detecta las variaciones en presión arterial.

Como **objetivos específicos** se han propuesto los siguientes:

- 1.- Estudiar la distribución de las mecanoproteínas PIEZO1 y PIEZO2 en el seno carotídeo y en el cuerpo carotídeo.
- 2.- Estudiar la distribución de las proteínas mecanosensibles (TRPA1, TRPC6, TRPM8, TRPV1 y TRPV4) de la superfamilia TRP en el seno carotídeo y en el cuerpo carotídeo.
- 3.- Estudiar la distribución de las mecanoproteínas PIEZO1 y PIEZO, y de las proteínas mecanosensibles (TRPA1, TRPC6, TRPM8, TRPV1 y TRPV4) en el ganglio petroso y en el ganglio simpático cervical superior humanos, que es donde se localizan los somas aferentes y eferentes, respectivamente, que inervan el seno y el cuerpo carotídeos.



# 4. Material y técnicas



## 4. Material y técnicas

### 4.1. Material

El estudio se realizó sobre piezas anatómicas que contenían la bifurcación de la arteria carótida común (tramo final de la arteria carótida común y los segmentos iniciales de las arterias carótidas interna y externa) y el cuerpo carotídeo. El material, procedía de 8 donantes multiorgánicos (5 hombres y 3 mujeres), con edades comprendidas entre los 38 y 68 años, fallecidos en accidentes de tráfico (Hospital Universitario Central de Asturias). Además, se incluyeron en el estudio el ganglio petroso (n = 6) y el ganglio simpático cervical superior (n = 4) de los mismos sujetos. El material se obtuvo de conformidad con la Legislación española (RD 1301/2006; Ley 14/2007; RD 1716/2011; Orden ECC/1404/2013) y las directrices de la Declaración de Helsinki II.

Las muestras de tejido se lavaron en solución salina a 4°C, se fijaron en formaldehído al 10 % en PBS 0,1 M, pH 7,4 durante 24 h a 4° C, se deshidrataron y se incluyeron de forma rutinaria en parafina. En el momento del uso, los bloques de parafina se cortaron en secciones seriadas de 10 µm de espesor y se montaron sobre portaobjetos gelatinizados. Todo el material se encuentra depositado en el biobanco del grupo de investigación SINPOS de la Universidad de Oviedo (Registro Nacional de Biobancos, Sección colecciones, Ref. C-0001627).

### 4.2. Técnicas

#### 4.2.1. Estudio estructural

Como control de la estructura del seno y cuerpo carotídeos se seleccionaron aleatoriamente 5 secciones por pieza, desparafinizadas y rehidratadas en una batería de xilol y etanoles de gradación descendente hasta el agua, se tiñeron con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson. A continuación, las secciones se lavaron en agua, se deshidrataron en una batería de etanoles de concentración creciente, se diafanizaron en xilol y se montaron con Entellan®. Las preparaciones se fotografiaron en un microscopio óptico Nikon Eclipse 80i acoplado a una cámara Nokia DS-5M.

#### 4.2.2. Inmunohistoquímica simple: método PAP

Para detectar la expresión de proteínas PIEZO, TRPA1, TRPC6, TRPM8, TRPV1 y TRPV4 en las paredes del seno carotideo (especialmente los nervios que lo suplen) y en cuerpo carotideo se utilizó el método de inmunohistoquímica indirecta peroxidasa-antiperoxidasa. Las secciones se desparafinaron y rehidrataron en una batería de xilol-etanoles de gradación creciente (desde 70° a 100°)-agua y se lavaron en tampón HCl Tris 0,05 M (pH 7,5) que contenía albúmina de suero bovino al 0,1 % y Tritón X-100 al 0,1 %. A continuación, se bloquearon la actividad de la peroxidasa endógena (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 5% durante 15 min) y las uniones inespecíficas (suero bovino fetal al 10 % durante 30 min).

**Tabla 4.1** – Anticuerpos primarios utilizados en el estudio

Antígeno	Especie	Dilución	Obtenido de
<b>PIEZO1</b>	Conejo	1:200	Alomone <sup>1</sup>
<b>PIEZO2</b>	Conejo	1:200	Sigma-Aldrich <sup>2</sup>
<b>TRPA1</b>	Conejo	1:100	Ab Serotec <sup>3</sup>
<b>TRPC6</b>	Conejo	1:100	Novus Biologicals Inc <sup>4</sup>
<b>TRPM8</b>	Conejo	1:200	Abcam <sup>5</sup>
<b>TRPV1</b>	Conejo	1:200	Gentaur Europe BVBA <sup>5</sup>
<b>TRPV4</b>	Conejo	1:200	Abcam <sup>1</sup>
NSE (clone BBS/NC/VI-H14)	Ratón	1:500	Dako <sup>6</sup>
NFP (clone 2F11)	Ratón	1:200	Roche <sup>7</sup>
Sinaptofisina (clone 27G12)	Ratón	Prediluido	Leica Biosystems <sup>8</sup>
S100 P	Ratón	1:500	Dako <sup>6</sup>

<sup>1</sup>Jerusalem, Israel; <sup>2</sup>Saint Louis, MS, USA; <sup>3</sup>Oxford, UK; <sup>4</sup>Littleton, CO, USA; <sup>5</sup>Brussels, Belgium; <sup>6</sup>Glostrup, Denmark; <sup>7</sup>Viena, Austria; <sup>8</sup>Madrid, Spain

**PIEZO1:** Anticuerpo policlonal desarrollado contra un péptido sintético (C)EDLKPQHRRHISIR, correspondiente a los aminoácidos 1863-1876 del PIEZO1 de rata.

**PIEZO2:** Anticuerpo policlonal desarrollado contra un péptido sintético del PIEZO2 humano con la secuencia: VFGFWAFGKHSAAADITSSLEDQVPGPFLVMVLIQFGT MVVD RALYLRK

**TRPA1:** contra el TRPA1 humano.

**TRPC6:** contra un péptido sintético de 14 aminoácidos procedente del extremo C-terminal del TRPC6 humano.

**TRPM8:** contra un péptido sintético parte del TRPM8 humano conjugado con una proteína transportadora inmunogénica.

**TRPV1:** contra los residuos 4-21 del extremo amino terminal de TRPV1 de rata.

**TRPV4:** contra un péptido sintético derivado del N-terminal citoplasmático de TRPV4 conjugado con una proteína transportadora inmunogénica.



A continuación, se incubaron las secciones durante toda la noche (aproximadamente 12 h) en una cámara húmeda a 4° C con los anticuerpos primarios (ver **Tabla 4.1**). Los anticuerpos se diluyeron en una solución de tampón Tris-HCl (0,05 M, pH 7,5) que contenía albúmina sérica bovina al 0,1 %, suero bovino al 0,2 % y Tritón X-100 al 0,1 %.

Tras de la incubación con los anticuerpos primarios, las secciones se lavaron en el mismo tampón Tris-HCl y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con IgG anti-ratón o IgG anti-conejo unidos a un polímero-HR marcado del kit Dako EnVision System (DakoCytomation, Dinamarca). Finalmente, las secciones se lavaron en tampón y se visualizó la inmunorreacción utilizando 3-3'-diaminobencidina como cromógeno.

Como controles de la especificidad de la inmunorreacción, se procesaron secciones representativas de forma idéntica a la indicada sustituyendo los anticuerpos primarios por sueros de conejo o ratón no inmunes, u omitiendo los anticuerpos primarios en la incubación. Para visualizar los detalles estructurales, las secciones se contrastaron ligeramente con hematoxilina de Mayer.

#### 4.2.3. Inmunofluorescencia con microscopía confocal

Secciones de 10  $\mu\text{m}$  de espesor que contenían el seno y el cuerpo carotídeo se procesaron para la detección simultánea de PIEZO1, PIEZO2, TRPM8, TRPV1 y TRPV4 con proteínas específicas para el marcaje de lo axones (enolasa neurona específica -NSE-, proteínas de los neurofilamentos -NFP-), células de Schwann y células glómicas de tipo II (proteína S100; S100P) y vesículas de neurotransmisores de las células glómicas de tipo I (sinaptofisina; Syn) (Vega et al., 2009; García-Mesa et al., 2022). Las uniones no específicas se redujeron mediante incubación de las secciones una solución de suero bovino de ternera al 25%, en solución tampón tris (TBS) durante 30 min. Posteriormente las secciones se incubaron con una mezcla 1:1 v/v de anticuerpo policlonal contra PIEZO1, PIEZO2, TRPM8, TRPV1 y TRPV4 y anticuerpos monoclonales contra NSE, NFP, Syn y S100P, en una cámara húmeda durante la noche a 4 °C. Después los cortes se lavaron con TBS y se incubaron durante una hora con IgG anti-conejo bovino conjugado con CFL488 (diluido 1:200 en TBS; sc-362260, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania) y luego, tras lavado en tampón, se incubaron otra vez durante otra hora con anticuerpo

anti-ratón de burro conjugado con CyTM3 (diluido 1:100 en TBS; Jackson-ImmunoResearch, Baltimore, MD, EE. UU.). Ambos pasos se realizaron en cámara húmeda oscura a temperatura ambiente. Las secciones finalmente se lavaron y los núcleos celulares se marcaron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 10 ng/mL).

Se omitió la realización de doble inmunofluorescencia para TRPA1 y TRPC6 porque no se obtuvieron resultados positivos en el estudio de inmunohistoquímica.

La triple fluorescencia se detectó utilizando un microscopio de fluorescencia automático Leica DMR-XA (Microscopía fotónica y Proceso de imagen, Servicios científico-técnicos, Universidad de Oviedo) junto con un software Leica Confocal (versión 2.5; Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Alemania), y las imágenes capturadas se procesaron con el software Image J (versión 1.43 g; Master Biophotonics Facility, Mac Master University Ontario; [www.macbiophotonics.ca](http://www.macbiophotonics.ca), acceso el 11 de enero de 2021).

Como controles de especificidad de inmunorreacción se utilizaron secciones representativas procesadas de la misma manera usando sueros de conejo o ratón no inmunes en lugar de anticuerpos primarios u omitiendo los anticuerpos primarios durante la incubación. En estas condiciones, no se observó inmunotinción positiva.

#### **4.2.4. Análisis cuantitativo**

Para evaluar la densidad de perfiles nerviosos y/o formaciones nerviosas sensitivas en el seno carotídeo, y de células glómicas en el cuerpo carotídeo, que expresan las proteínas PIEZO1 y PIEZO2, se evaluaron 10 campos por sección en 5 secciones por proteína. El estudio cuantitativo se diseñó para determinar el porcentaje de tejido que mostraba inmunorreacción para las proteínas PIEZO y el porcentaje de la emergencia de cada proteína PIEZO con los marcadores de células glómicas y de marcadores axónicos o gliales. La evaluación fue llevada a cabo por dos observadores independientes utilizando un objetivo de 40x, y un ocular 10x. utilizando un sistema automático de análisis de imágenes (Quantimet 550, Leica, QWIN Program).

Además, se realizó un análisis cuantitativo de imágenes en el ganglio petroso y en el ganglio simpático cervical superior procesados para la detección de las distintas subunidades ASIC utilizando un sistema automático de análisis de imágenes (Quantimet 550, Leika, QWIN Program). Se evaluó el porcentaje y el tamaño (diámetro medio en  $\mu\text{m}$ ) de las neuronas inmunorreactivas para cada una de ellas. Las mediciones se realizaron en 3 secciones por muestra, separadas 200  $\mu\text{m}$  entre ellas, para evitar medir la misma neurona dos veces, evaluando cinco campos seleccionados aleatoriamente por sección (2,5  $\text{mm}^2$ ). Para la evaluación del tamaño del cuerpo celular solo se consideraron los perfiles neuronales con núcleos aparentes, y las neuronas se dividieron en 3 clases de tamaño:  $\leq 20 \mu\text{m}$  de diámetro consideradas como neuronas pequeñas, 21-50  $\mu\text{m}$  consideradas como neuronas intermedias y  $> 50 \mu\text{m}$  consideradas como neuronas grandes.



# 5. Resultados

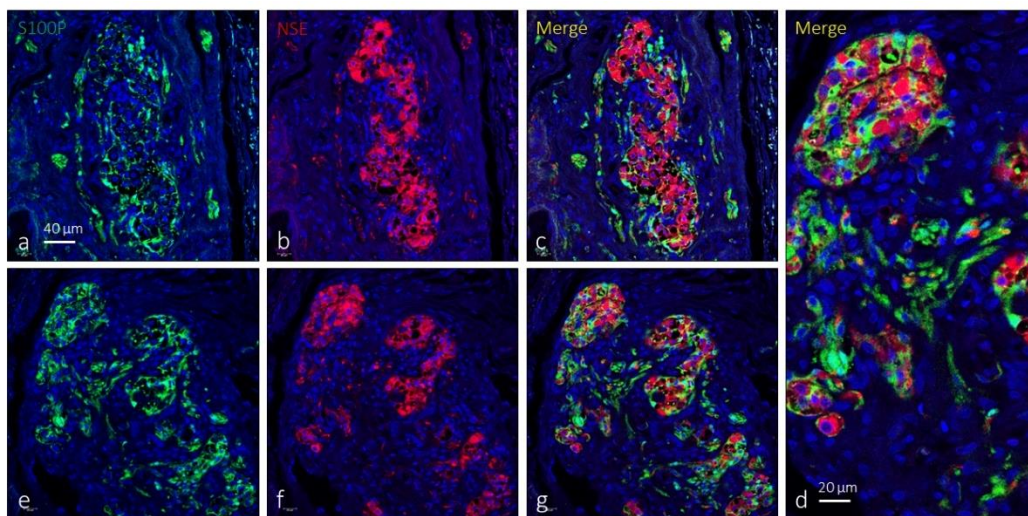


## 5. Resultados

### 5.1. Estructura y tipificación celular en el cuerpo y seno carotídeos

El seno carotideo tiene una estructura arterial típica con sus paredes formadas por tres capas: endotelio, capa muscular y adventicia. Con relación a las paredes de las arterias carótidas interna y externa, sin embargo, son mucho más delgadas. Las nuestras observaciones son idénticas a las de la totalidad de los autores y no se insistirá más en el tema (datos no mostrados).

Por su lado, el cuerpo carotideo está formado por grupos de células tipo I y está circundadas por células de tipo II (**Figura 5.1**). Entre los glomoides hay tabiques de tejido conectivo que contienen vasos y nervios. Teniendo en cuenta que este trabajo de tesis doctoral se centra en el análisis del posible potencial mecanoreceptor de las células de tipo I se evitará en todo momento denominarlas quimiorreceptoras.

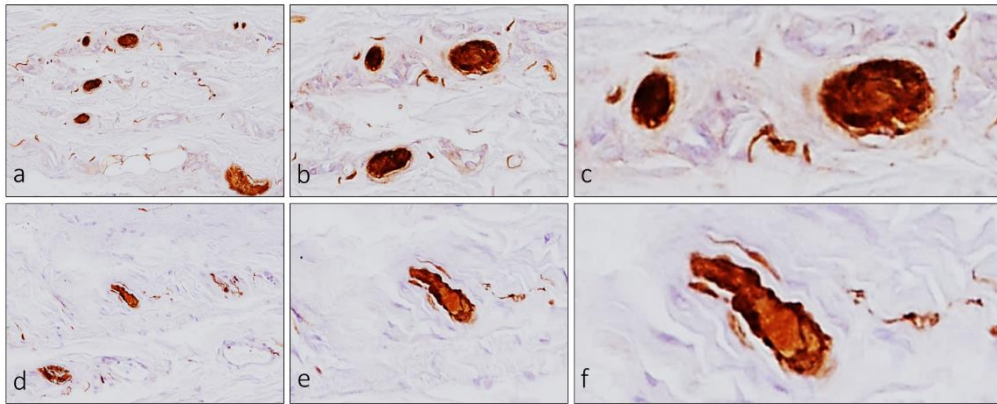


**Figura 5.1.** Detección y localización con inmunofluorescencia asociada a microscopía laser confocal de S100P (fluorescencia verde) y NSE de las células glómicas de tipo I (fluorescencia verde) en el cuerpo carotideo humano. La fluorescencia azul corresponde con los núcleos celulares marcados con DAPI.

### 5.2. Inervación del seno y del cuerpo carotideo

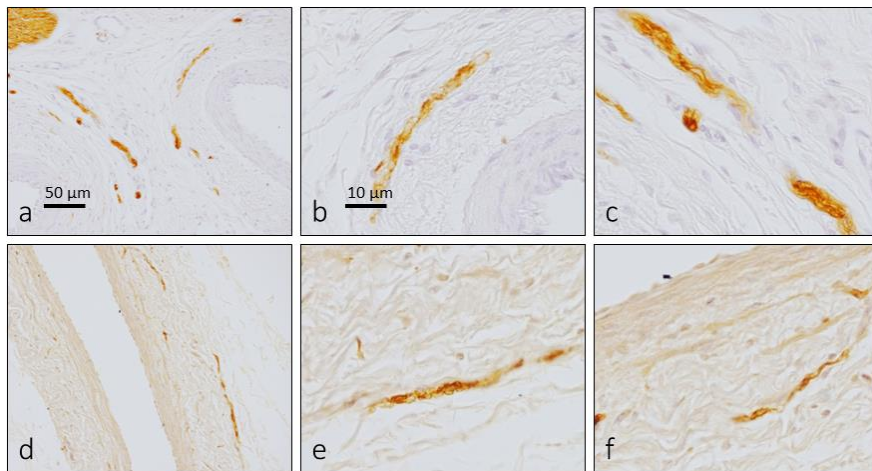
El seno carotideo está inervado por las terminaciones aferentes de las neuronas que tienen su cuerpo en el ganglio petroso (ver más adelante). Las terminaciones aferentes de estas, en la adventicia del seno carotideo, terminan formando distintos morfotipos de formaciones nerviosas sensitivas, que en algunos casos pueden identificarse como

corpúsculos sensitivos de tipo Pacini (**Figura 5.2**). también se han identificado terminaciones nerviosas libres y arboriformes.



**Figura 5.2.** Detección inmunohistoquímica de S100P en la adventicia del seno carotídeo humano. En ambos casos se observan terminaciones nerviosas libres y corpúsculo Pacini-like.

Con carácter general no se han observado perfiles de fibras nerviosas en la capa muscular (**Figura 5.3**).



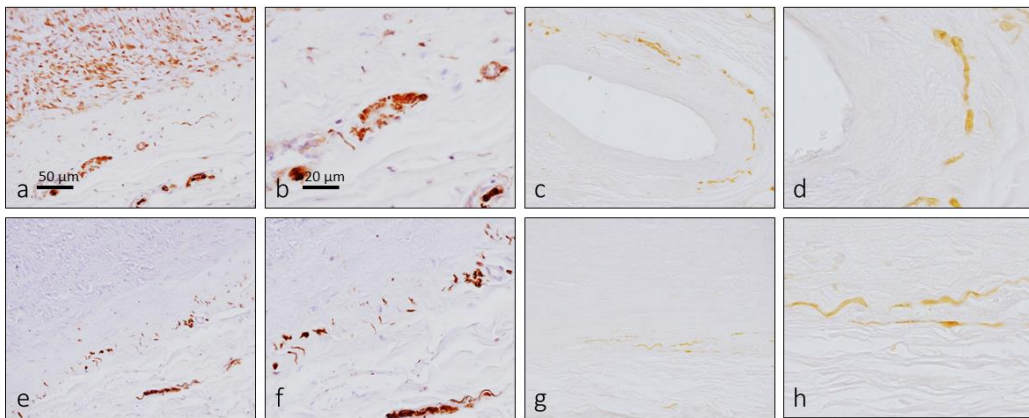
**Figura 5.3.** Detección inmunohistoquímica de S100P en la adventicia del seno carotídeo humano. En ambos casos se observan terminaciones nerviosas en la adventicia vascular.

### 5.3. Expresión de canales mecanosensibles en el seno carotídeo: nervios y paredes de los vasos carotídeos

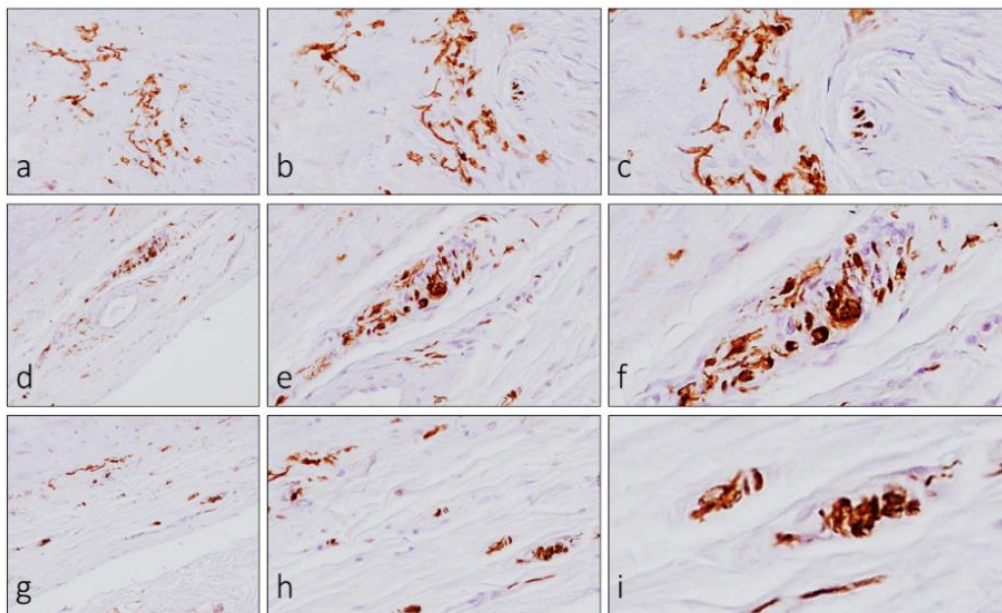
No se detectó inmunorreacción positiva para TRPM8, mientras que el resto de los antígenos investigados se detectaron en formaciones nerviosas de distintas morfologías en el aparato nervioso del seno carotídeo.



La inmunorreacción para PIEZO1 se localizó en células musculares de las paredes de las arterias carótidas (**Figura 5.4a**) y en los perfiles de nervios y formaciones nerviosas sensitivas de la pared de esta arteria. En la adventicia del seno carotídeo PIEZO1 se detectó exclusivamente en terminaciones nerviosas arborescentes muy finas, terminaciones nerviosas libres y en fibras nerviosas aisladas perivasculares, pero no en la pared del seno (**Figura 5.4c-h**)



**Figura 5.4.** Detección inmunohistoquímica de PIEZO1 en la capa muscular y la adventicia de la carótida interna (a-b) y la adventicia del seno carotídeo.

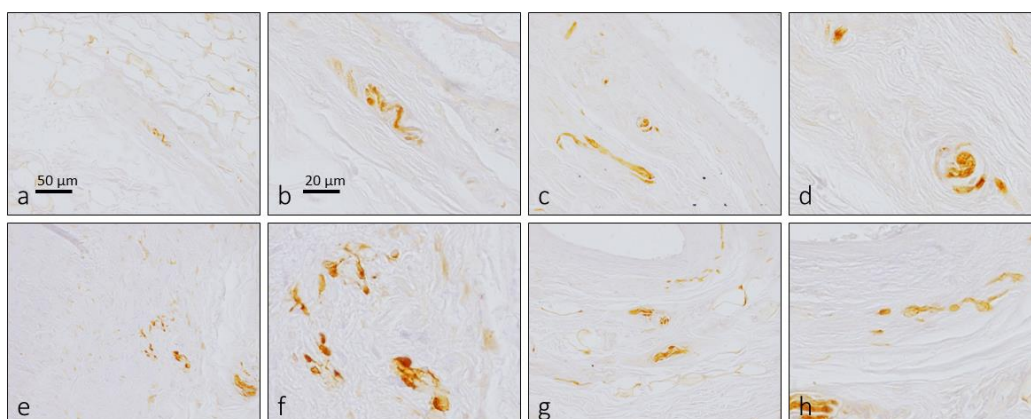


**Figura 5.5.** Detección inmunohistoquímica de PIEZO2 en la capa muscular y la adventicia de las arterias carótidas (d-i) y la adventicia del seno carotídeo (a-c).

Por lo que respecta a la PIEZO2, se ha observado inmunorreacción positiva en las paredes del seno carotídeo formando estructuras muy semejantes a las terminaciones en flor,

arboriformes y corpúsculos de Ruffini-like (**Figura 5.5a-c**) Apparently the density of this type of sensitive structure was very similar in all subjects studied without variations that can be related to age.

Además, en la capa muscular de las arterias carótidas interna (**Figura 5.5d-f**) y externa (**Figura 5.5g-i**) se han detectado formaciones nerviosas sensitivas de tipo Ruffini-like así como fibras nerviosas aisladas con una intensa inmunorreacción para esta mecanoproteína.



**Figura 5.6.** Detección inmunohistoquímica de TRPV1 (a-d) y TRPV4 (e-h) en la adventicia del seno carotídeo humano.

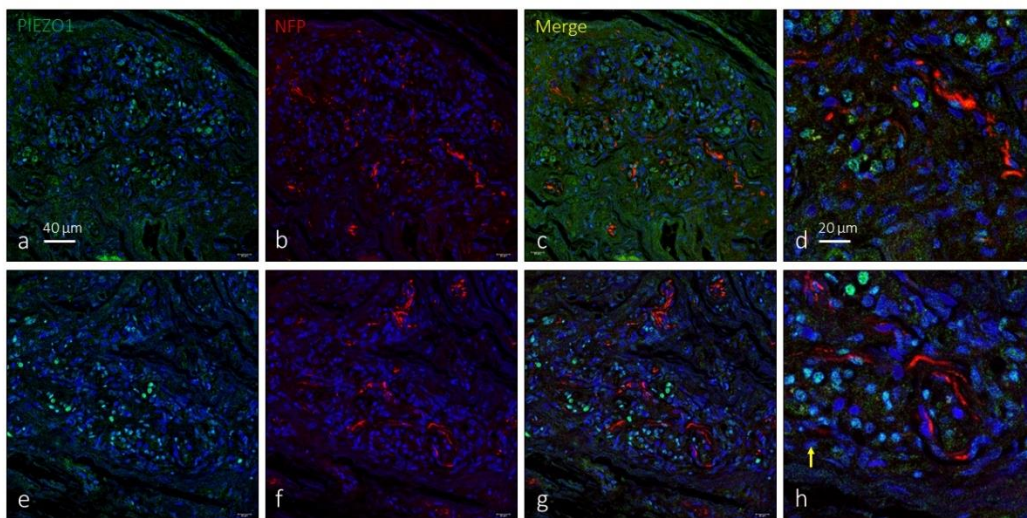
En cuanto a los canales de la familia TRP vanilloide, la inmunorreacción fue débil pero específica tanto para TRPV1 (**Figura 5.6a-d**) como para TRPV4 (**Figura 5.6e-h**). En el primer caso se trataba de perfiles nerviosos muy finos que ocasionalmente formaban estructuras paciniformes o laminares simples. Las imágenes de los perfiles nerviosos inmunorreactivos para TRPV4 eran delicadas fibras nerviosas aisladas y terminaciones en flor y arboriformes.

En conjunto las formaciones nerviosas sensitivas que expresan las mecanoproteínas PIEZO1, PIEZO2, TRPV1 y TRPV4 son equiparables a las descritas por otros autores en las paredes del seno carotídeo de diferentes especies animales por lo que puede afirmarse que los barorreceptores carotídeos humanos pueden realizar la mecanotransducción mediante esas mecanoproteínas.

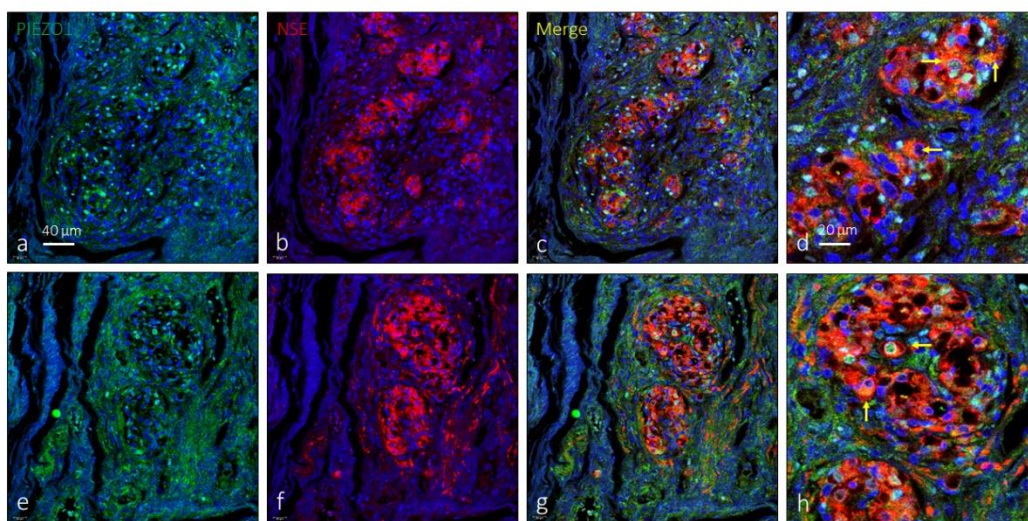
## 5.4. Expresión de canales mecanosensibles en el cuerpo carotídeo

### 5.4.1. Canal PIEZO1

En las secciones del cuerpo carotídeo procesadas para la detección simultánea de PIEZO1 y un marcador de fibras nerviosas, se observó en todos los casos una inmunorreacción muy débil en células no identificables morfológicamente pero que aparentemente son grupo de células de tipo II. En ningún caso se detectó la presencia de PIEZO1 en los terminales nerviosos del interior del cuerpo carotídeo (**Figura 5.7**).

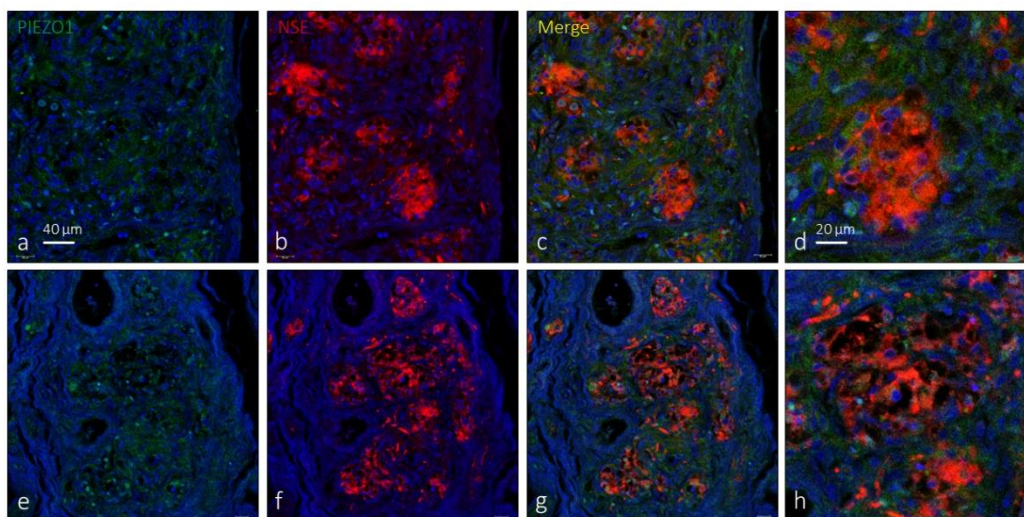


**Figura 5.7.** Detección y localización inmunofluorescencia asociada a microscopía laser confocal de PIEZO1 (fluorescencia verde) y NFP en los nervios del glomus (fluorescencia verde) en el cuerpo carotídeo humano. La fluorescencia azul corresponde con los núcleos celulares marcados con DAPI.



**Figura 5.8.** Detección y localización inmunofluorescencia asociada a microscopía laser confocal de PIEZO1 (fluorescencia verde) y NSE en las células de tipo I (fluorescencia verde) en el cuerpo carotídeo humano. La fluorescencia azul corresponde con los núcleos celulares marcados con DAPI.

Tampoco fue abundante la expresión de PIEZO1 por parte de las células tipo I del glomus caroticum. En la mayoría de las secciones no se detectó co-localización de PIEZO1 con NSE (Figuras 5.8 y 5.9) aunque ocasionalmente células aisladas de algunos clusters fueron inmunorreactivas (Figura 5.8d y h).

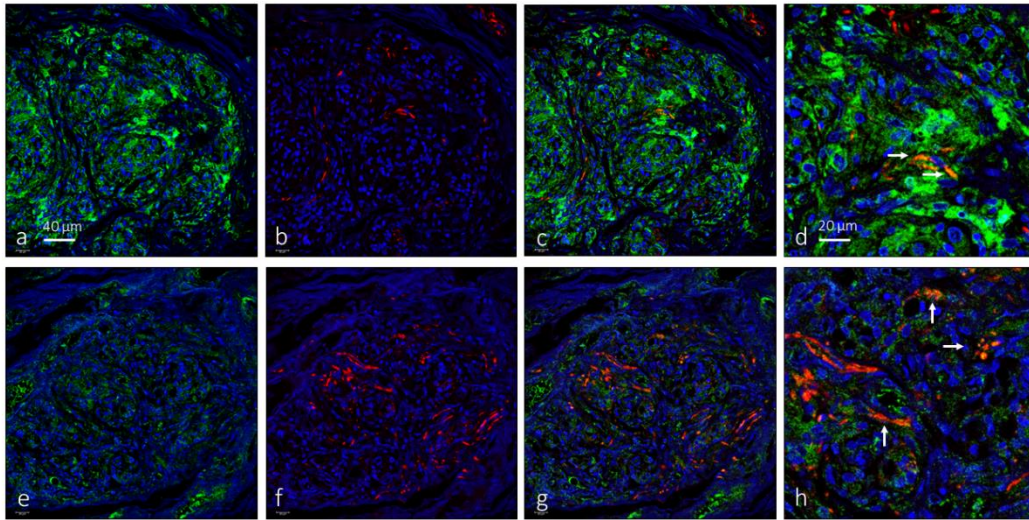


**Figura 5.9.** Detección y localización inmunofluorescencia asociada a microscopía laser confocal de PIEZO1 (fluorescencia verde) y NSE en las células de tipo I (fluorescencia verde) en el cuerpo carotídeo humano. La fluorescencia azul corresponde con los núcleos celulares marcados con DAPI.

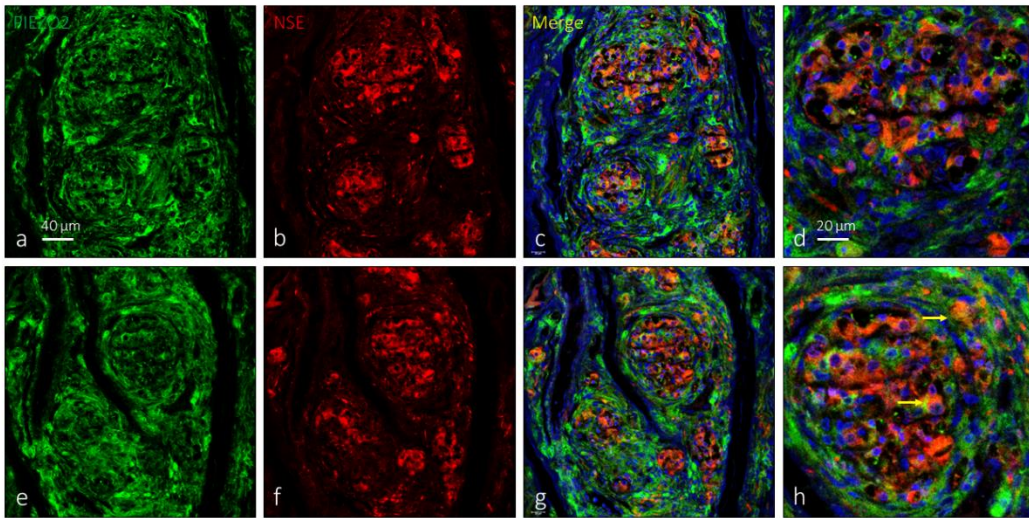
El área ocupada por la inmunorreacción específica para PIEZO1 fue del  $1,1 \pm 0,9\%$  del total de la sección, y el área ocupada por la emergencia tanto de células glómicas como de nervios fue del  $1,0 \pm 0,9\%$  del total de la sección (Tabla 5.1).

#### 5.4.2. Canal PIEZO2

Tampoco el canal iónico PIEZO2 se expresa de una forma potente en el seno carotídeo, al menos en las células de tipo I. Para esta proteína se han observado dos patrones de localización dentro incluso del mismo órgano: en algunos glomérulos PIEZO2 tenía una localización predominante en las células gliales (Figura 5.10a-d, Figura 5.11 y Figura 5.12) mientras que otros carecían prácticamente de expresión. Pero, además, también se ha observado co-localización de PIEZO2 con NFP dando a significar que se localiza en las fibras nerviosas (Figura 5.10) y en una subpoblacion muy escasa de células glómicas de tipo I (Figura 5.11h).



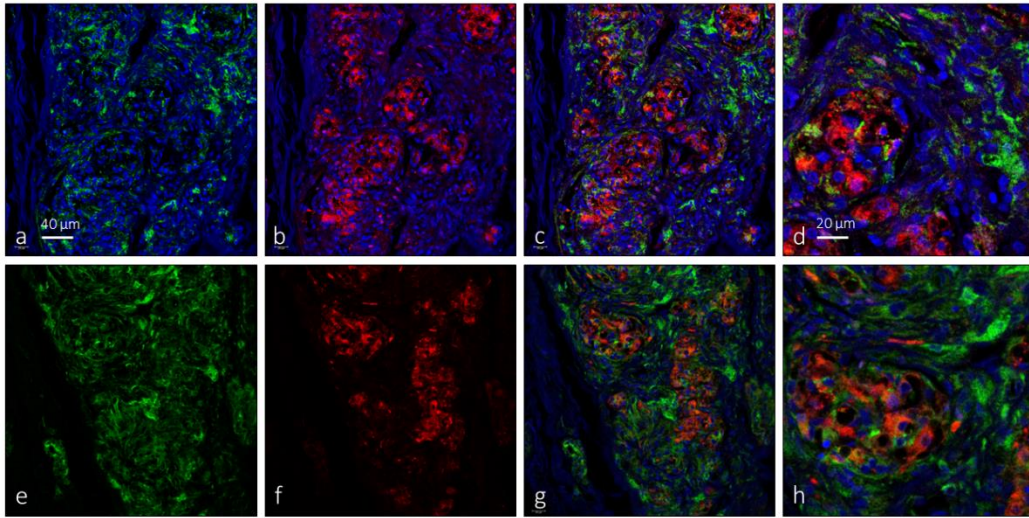
**Figura 5.10.** Detección y localización inmunofluorescencia asociada a microscopía láser confocal de PIEZO2 (fluorescencia verde) y NFP en los nervios del glomus (fluorescencia verde) en el cuerpo carotídeo humano. La fluorescencia azul corresponde con los núcleos celulares marcados con DAPI.



**Figura 5.11.** Detección y localización inmunofluorescencia asociada a microscopía láser confocal de PIEZO2 (fluorescencia verde) y NSE en las células de tipo I (fluorescencia verde) en el cuerpo carotídeo humano. La fluorescencia azul corresponde con los núcleos celulares marcados con DAPI.

El área ocupada por la inmunorreacción específica para el PIEZO2 fue del  $58,1 \pm 5,7\%$  del total de la sección, y el área ocupada por la emergencia tanto de células glómicas como de nervios fue del  $8,4 \pm 2,2\%$  del total de la sección (**Tabla 5.1**).

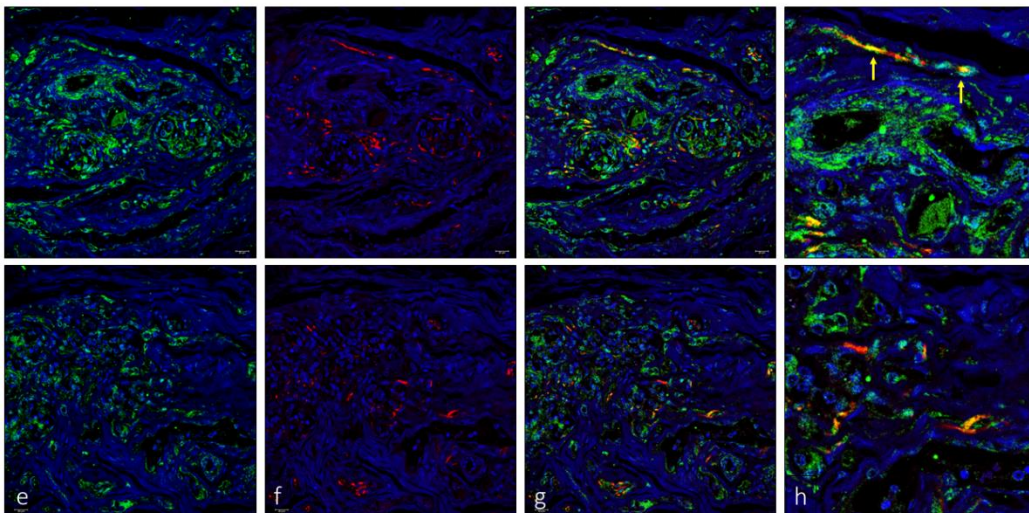
Por tanto, puede afirmarse que las mecano proteínas PIEZO1 y PIEZO2 se expresan de una forma irregular en el cuerpo carotídeo. Mientras PIEZO1 no se expresa en los nervios y prácticamente tampoco en las células de tipo I, PIEZO2 se detecta en nervios, una subpoblaciones de células tipo I y en las células de tipo II.



**Figura 5.12.** Detección y localización inmunofluorescencia asociada a microscopía laser confocal de PIEZO2 (fluorescencia verde) y NSE en las células de tipo I (fluorescencia verde) en el cuerpo carotídeo humano. La fluorescencia azul corresponde con los núcleos celulares marcados con DAPI.

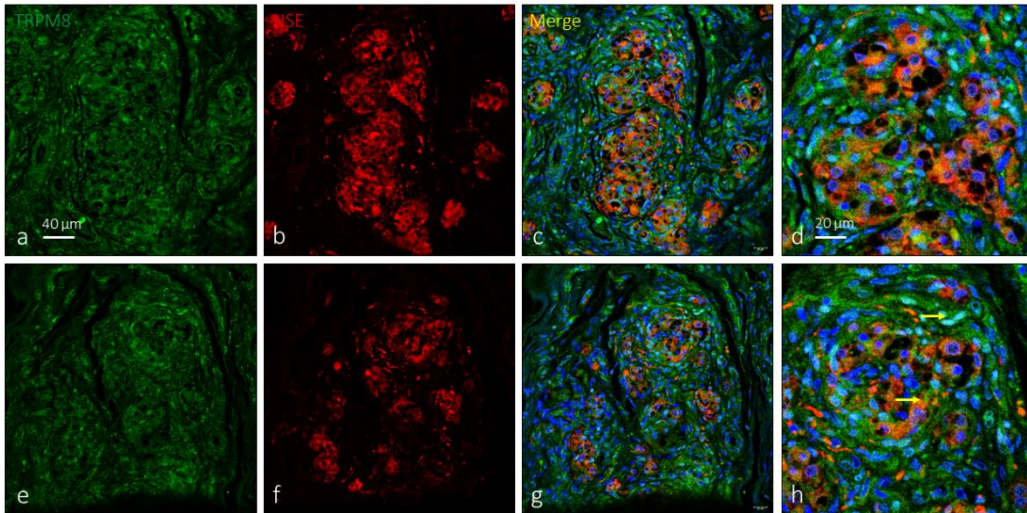
#### 5.4.3. Canal TRPM8

Aunque el canal TRPM8 se asocia preferentemente a la detección del frío, existen evidencias de que puede comportarse como mecanoreceptor y está presente en una subpoblación neuronal en el ganglio petroso cuyas neuronas proyectan al cuerpo carotídeo.

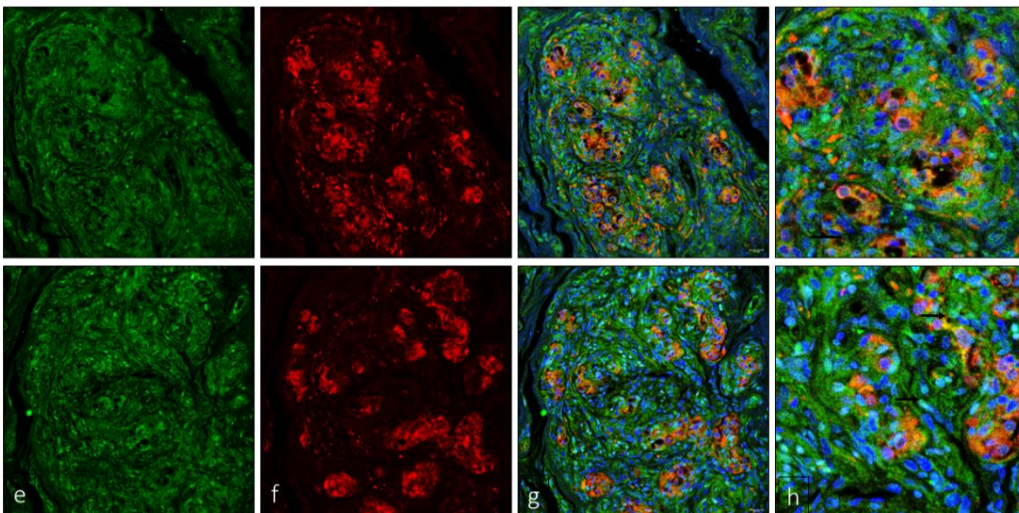


**Figura 5.13.-** Detección y localización inmunofluorescencia asociada a microscopía laser confocal de TRPM8 (fluorescencia verde) y NFP en los nervios del glomus (fluorescencia verde) en el cuerpo carotídeo humano. La fluorescencia azul corresponde con los núcleos celulares marcados con DAPI.

El patrón de distribución de la inmunorreacción sugiere que esta proteína se localiza tanto en las células de tipo I como en las de tipo II. Los análisis de co-localización con marcadores de fibras nerviosas muestran que TRPM8 está presente en las fibras nerviosas localizadas en las partes más periféricas del cuerpo carotídeo, pero no se aprecian en la parte central de los glomoides en contacto con las células tipo I o tipo II (Figura 5.13).



**Figura 5.14.** Detección y localización inmunofluorescencia asociada a microscopía laser confocal de TRPM8 (fluorescencia verde) y NSE en las células de tipo I (fluorescencia verde) en el cuerpo carotídeo humano. La fluorescencia azul corresponde con los núcleos celulares marcados con DAPI.



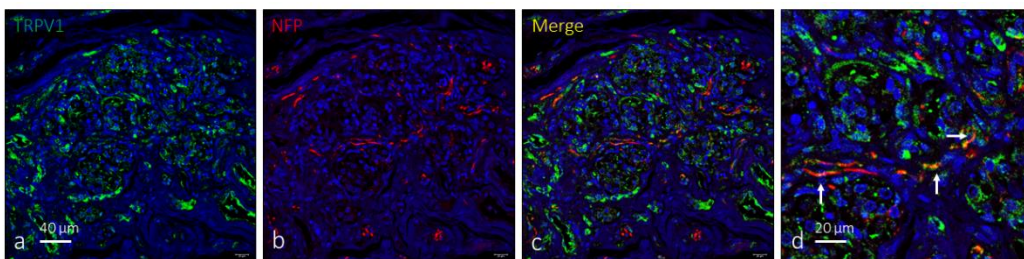
**Figura 5.15.** Detección y localización inmunofluorescencia asociada a microscopía laser confocal de TRPM8 (fluorescencia verde) y NSE en las células de tipo I (fluorescencia verde) en el cuerpo carotídeo humano. La fluorescencia azul corresponde con los núcleos celulares marcados con DAPI.

Además, TRPM8 se detecta de manera inequívoca en una subpoblación de células de tipo I, aunque es aparentemente más prominente en las de tipo II (Figuras 5.14 y 5.15).

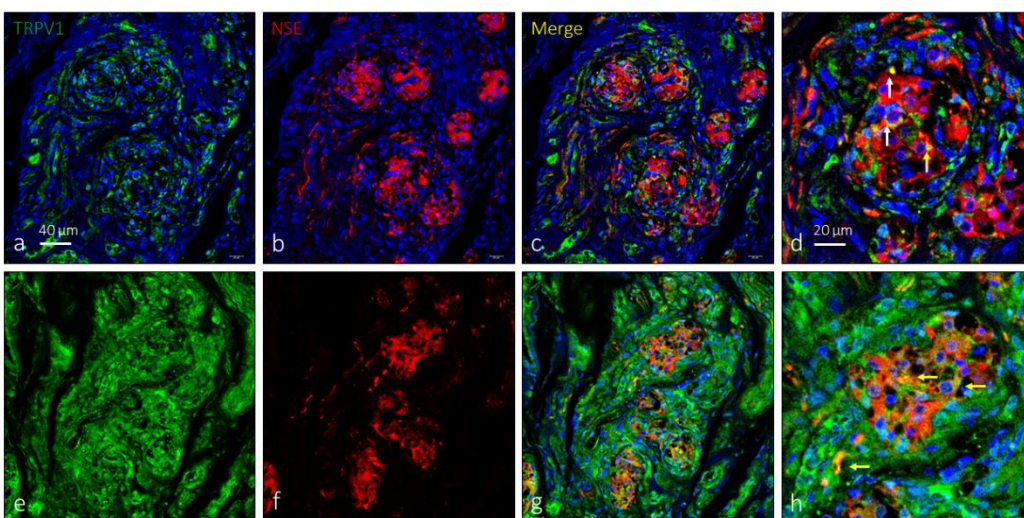
El área ocupada por la inmunorreacción específica para TRPM8 fue del  $71,3 \pm 8,1\%$  del total de la sección, y el área ocupada por la emergencia tanto de células glómicas como de nervios fue del  $37,7 \pm 5,9\%$  del total de la sección (Tabla 5.1).

#### 5.4.4. Canal TRV1

El patrón de distribución de la inmunorreacción para TRPV1 es consistente con el marcaje de nervios y de células glómicas. La mayoría de las fibras nerviosas del cuerpo carotídeo expresan inmunorreacción para este canal iónico (Figura 5.16).



**Figura 5.16.-** Detección y localización inmunofluorescencia asociada a microscopía laser confocal de TRPV1 (fluorescencia verde) y NFP en los nervios del glomus (fluorescencia verde) en el cuerpo carotídeo humano. La fluorescencia azul corresponde con los núcleos celulares marcados con DAPI.



**Figura 5.17.** Detección y localización inmunofluorescencia asociada a microscopía laser confocal de TRPV1 (fluorescencia verde) y NSE en las células de tipo I (fluorescencia verde) en el cuerpo carotídeo humano. La fluorescencia azul corresponde con los núcleos celulares marcados con DAPI.

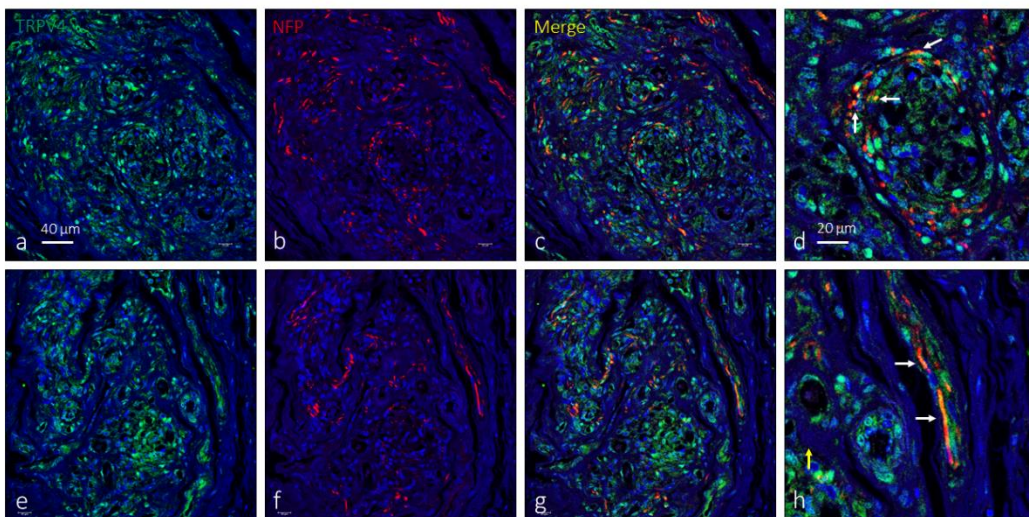


Igualmente se ha observado inmunorreacción para esta proteínas en una subpoblación de células de tipo I, aunque son las células de tipo II las que muestran una inmunorreacción más intensa (Figura 5.17).

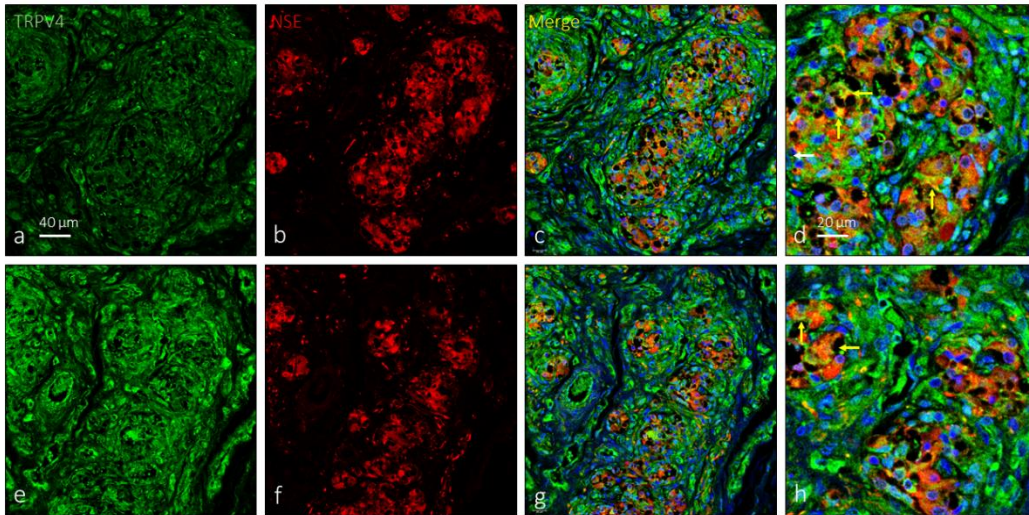
El área ocupada por la inmunorreacción específica para TRPV1 fue del  $62,3 \pm 7,6\%$  del total de la sección, y el área ocupada por la emergencia tanto de células glómicas como de nervios fue del  $24,7 \pm 8,1\%$  del total de la sección (Tabla 5.1).

#### 5.4.5. Canal TRPV4

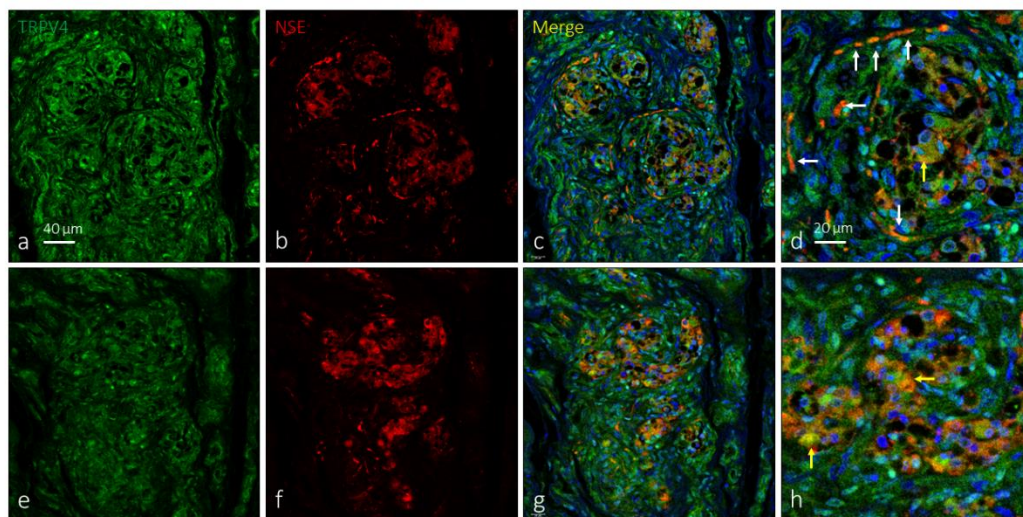
El otro canal de la familia TRP vanilloide estudiado fue TRPV4. Esta proteína se detectó en las fibras nerviosas situadas tanto en la parte externa como interna de los clusters de células glómicas (Figura 5.18).



**Figura 5.18.-** Detección y localización inmunofluorescencia asociada a microscopía laser confocal de TRPV4 (fluorescencia verde) y NFP en los nervios del glomus (fluorescencia verde) en el cuerpo carotídeo humano. La fluorescencia azul corresponde con los núcleos celulares marcados con DAPI.



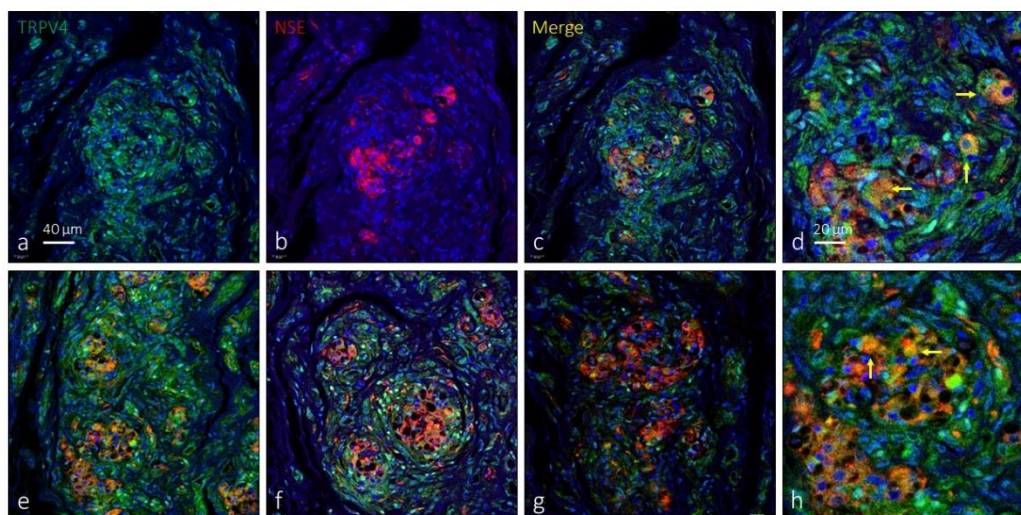
**Figura 5.19.-** Detección y localización inmunofluorescencia asociada a microscopía laser confocal de TRPV4 (fluorescencia verde) y NSE en las células de tipo I (fluorescencia verde) en el cuerpo carotídeo humano. La fluorescencia azul corresponde con los núcleos celulares marcados con DAPI.



**Figura 5.20.-** Detección y localización inmunofluorescencia asociada a microscopía laser confocal de TRPV4 (fluorescencia verde) y NSE en las células de tipo I (fluorescencia verde) en el cuerpo carotídeo humano. La fluorescencia azul corresponde con los núcleos celulares marcados con DAPI.

Pero, sobre todo, mostró una expresión muy marcada en las células glómicas tanto de tipo I como de tipo II. En todas las secciones estudiadas se detectó una expresión clara en las células de tipo I identificadas por su inmunorreacción para NSE, además de en perfiles nervioso también identificables con esta proteína (Figuras 5.19 a 5.21).

El área ocupada por la inmunorreacción específica para TRPV4 fue del  $61,1 \pm 5,6\%$  del total de la sección, y el área ocupada por la emergencia tanto de células glómicas como de nervios fue del  $42,8 \pm 7,1\%$  del total de la sección (Tabla 5.1).



**Figura 5.21.-** Detección y localización inmunofluorescencia asociada a microscopía laser confocal de TRPV4 (fluorescencia verde) y NSE en las células de tipo I (fluorescencia verde) en el cuerpo carotídeo humano. La fluorescencia azul corresponde con los núcleos celulares marcados con DAPI.

**Tabla 5.-** % de área inmunorreactiva para las proteínas estudiadas y % de área de emergencia con los marcadores nerviosos y de las células de tipo I.

	PIEZO1	PIEZO2	TRPM8	TRPV1	TRPV4
Área total (fluorescencia verde) %	$1,1 \pm 0,9$	$58,1 \pm 5,7$	$71,3 \pm 8,1$	$62,3 \pm 7,6\%$	$61,1 \pm 5,6$
Área de emergencia %	$1 \pm 0,9$	$8,4 \pm 2,2$	$37,7 \pm 5,9$	$24,7 \pm 8,1$	$42,8 \pm 7,1$

#### 5.4. Expresión de canales mecanosensibles en ganglio petroso y ganglio simpático cervical superior

Teniendo en cuenta que las neuronas del ganglio petroso son las responsables de la inervación aferente del seno carotídeo y del cuerpo carotídeo, se realizó un estudio paralelo en estas formaciones. Además, se investigó su presencia en las neuronas del ganglio simpático cervical superior.

En el ganglio petroso se detecto inmunorreacción para PIEZO1, PIEZO2, TRPM8, TRPV1 y TRPV4 aunque el porcentaje de neuronas marcadas en cada unos de los subtipos de

tamaños preestablecidos fue diferente para cada una de ellas. No obstante, muchas de ellas se encontraban dentro del rango de tamaños de las neuronas consideradas como mecanorreceptoras, es decir, neuronas intermedias (30-50  $\mu\text{m}$  de diámetro) y neuronas grandes ( $> 50 \mu\text{m}$  de diámetro). En cuanto al ganglio simpático cervical superior, se detectó inmunorreacción en la mayoría de los somas neuronales para PIEZO1, PIEZO2, TRPV1 y TRPV4, y en menor proporción para TRPM8 (**Tabla 5.2**).

**Tabla 5.2.** Porcentajes de neurona que expresan las subunidades ASIC en el ganglio petroso y en el ganglio cervical superior

	PIEZO1	PIEZO2	TRPM8	TRPV1	TRPV4
Ganglio petroso	23%	86%	12%	44%	88%
	NP 19%	NP 16%	NP 31%	NP 80%	NP 14%
	NI 22%	NI 81%	NI 26%	NI 21%	NI 80%
	NG 8%	NG 100%	NG 14%	NG 100%	NG 100%
GSCS	71%	96%	63%	84%	93%

# 6. Discusión



## 6. Discusión

### 6.1. Consideraciones generales

El presente trabajo de Tesis Doctoral se diseñó para dar contribuir al conocimiento de los mecanismos moleculares mediante los cuales el seno carotídeo humano detecta las variaciones de presión, y para investigar si el cuerpo carotídeo, considerado actualmente como un órgano multisensorial, expresa canales mecanosensibles. La función mecanosensora del seno carotídeo es bien conocida desde comienzos del siglo pasado (Nguyen et al., 2008; Munster et al., 2016; Andani y Khan, 2020) aunque solo en los últimos cinco años comienzan a conocerse los mecanismos moleculares de la mecanotransducción en los barorreceptores (Zeng et al., 2018; Min et al., 2019) y en estos procesos están implicadas algunas mecanoproteínas, especialmente PIEZO1 y PIEZO2, pero también otras potenciales como ASIC2 (ver Chen et al., 2018) y tentonina (Hong et al., 2016, Lu et al., 2020).

Por su lado, el cuerpo carotídeo es considerado clásicamente como un órgano capaz de detectar los niveles arteriales de arteriales de oxígeno y dióxido de carbono (Iturriaga, 2018; Ortega-Sáenz y López-Barneo, 2020; Iturriaga et al., 2021), pero también la acidosis (Levin y Buck, 2015). En esta última función nuestro grupo de trabajo ha detectado muy recientemente la existencia de todas las subunidades de los canales ASIC en las fibras nerviosas aferentes y eferentes que lo suplen, así como en una subpoblaciones de células glómicas de tipo I, quimiorreceptoras (Martínez-Barbero et al., 2023).

En las páginas que siguen se discutirán los resultados específicos relacionados con los objetivos. Previamente, es necesario hacer una serie de consideraciones, de carácter técnico principalmente.

Las piezas del seno y cuerpo carotídeos estudiadas procedían de autopsias de pacientes fallecidos en accidentes de tráfico, pero se desconocen patologías que pudieran padecer y que pudieran alterar la estructura y patrón de expresión de las proteínas investigadas en este trabajo. Cambios en el cuerpo carotídeo se han descrito en la hipertensión (Iturriaga et al., 2017; Felipe et al, 2023), insuficiencia cardiaca-respiratoria (Schultz et

al., 2013, 2015) o metabolopatías (Conde et al., 2018; Sacramento et al., 2020) y síndromes que asocian síntomas y signos de todas esas patologías como la apnea obstructiva del sueño (Prabhakar et al., 2020, 2023; Iturriaga et al., 2021). Por otro lado, el rango de edad de los sujetos de los que procedían las piezas estudiadas era bastante amplio (38 y 68 años) y se han descrito en el cambios edad-dependientes y, sobre todo relacionados con el envejecimiento (Di Giulio, 2018; Di Giulio et al., 2023). Por tanto, es posible que todos estos factores relacionados con el material hayan podido modificar los resultados. Sin embargo, no los consideramos de importancia en nuestro caso ya que no se apreciaron variaciones entre los grupos de edad ni con el sexo de los sujetos.

Debemos comentar igualmente que los resultados para los canales iónicos TRPA1 y TRPC6 originalmente incluidos en el estudio fueron siempre negativos, tanto en los órganos periféricos como en los ganglios petroso y simpático cervical superior. Ya que ambos han sido detectados previamente en ellos, en ganglios murinos, es posible que la discrepancia en los resultados se deba a problemas técnicos de pérdida de antigenicidad o a diferencias especie-específicas.

## 6.2. Discusión de los resultados

Los barorreceptores son sensores de presión en neuronas especializadas que detectan específicamente el estiramiento dentro de las paredes arteriales, que ocurre cuando aumenta la presión arterial. Cuando los barorreceptores se estiran, transmiten señales aferentes (sensoriales) al núcleo tractus solitarii en la médula. Estas señales inhiben el flujo de salida simpático y aumentan la salida parasimpática específicamente al corazón, lo que desencadena la vasodilatación y reduce la PA al disminuir tanto la frecuencia cardíaca como la contractilidad cardíaca. Por el contrario, la hipotensión súbita disminuye la activación de las neuronas barosensantes dentro del seno carotídeo, lo que conduce a un aumento del flujo de salida simpático, la retirada parasimpática y elevaciones de la presión arterial. Se encuentran localizados en el seno carotídeo y el arco aórtico, y en mucha menor medida en las paredes de algunas arterias de gran calibre de la cavidad torácica.



A pesar de décadas de investigación, la identidad molecular precisa del barorreceptor ha permanecido esquiva. La teoría más popular es que los barorreceptores son canales iónicos ubicados en las terminales nerviosas dentro de las estructuras arteriales; sin embargo, ninguno de los canales examinados ha explicado por completo la mecanodetección de barorreceptores. Hasta donde nosotros conocemos no existen datos sobre la presencia de mecanoproteínas en los terminales de los barorreceptores del seno carotídeo humano. Los datos disponibles se centran en el seno carotídeo sobre las proteínas PIEZO1 y PIEZO2

(Wang et al., 2016; Zeng et al., 2018; Min et al., 2019) y la tentonina (Lu et al., 2020). Nuestros hallazgos ponen de manifiesto que también las mecanoproteínas TRPV4 y TRPV1 están presentes en el aparato nervioso del seno carotídeo y que, por tanto, estas mecanoproteínas también pueden jugar un papel en la mecanotransducción del seno carotídeo. Zeng et al. (2018) han demostrado el papel de PIEZO1 y PIEZO2 en el seno carotídeo de ratones al demostrar la eliminación del gen para estos canales causa un cuadro clínico similar al síndrome de "fallo barorreceptor". Nuestros hallazgos al respecto en el ganglio petroso son coincidentes con los de otros autores para PIEZO2 pero no para PIEZO1 ya que no lo hemos detectado en nuestro estudio. Las neuronas sensitivas que inervan los grandes vasos del sistema vascular proporcionan información esencial para el control de la frecuencia cardíaca, la presión arterial y la respiración. Los barorreceptores detectan fluctuaciones momentáneas en la presión arterial, por ejemplo, durante el movimiento o los cambios posturales, y aseguran la estabilización en tiempo real del gasto cardiovascular para garantizar un flujo sanguíneo adecuado al cerebro y al cuerpo. (Min et al., 2019).

A través de los sistemas fisiológicos, las neuronas mecanosensoriales muestran una gran variabilidad de morfologías terminales altamente especializadas para la sensación de fuerza. Las neuronas somatosensoriales que inervan la piel y que subyacen a la sensación táctil muestran una diversidad de tipos terminales, incluidas las terminaciones corpusculares, los contactos de las células de Merkel, las terminaciones lanceoladas, las terminaciones de Ruffini y las terminaciones nerviosas libres (Abraira y Ginty, 2013; Cobo et al., 2020). En el caso de los terminales de los barorreceptores del seno carotídeo

hemos observado terminaciones libres, terminaciones en flor y arboriformes, así como terminaciones de tipo Ruffini-like.

Por lo que se refiere al cuerpo carotídeo. Nuestro trabajo es el primero que ha investigado la presencia de canales iónicos mecanosensibles en él. Nuestros resultados para PIEZO1 y PIEZO2 sugieren que esta formación tiene una participación muy escasa en la detección de estímulos mecánicos, aunque no se descarta, ya que algunas poblaciones de células de tipo I y de tipo II expresan ambas proteínas. Además, algunos terminales nerviosos del cuerpo carotídeo son positivos para PIEZO2, pero no para PIEZO1. Estos hallazgos son compatibles con los realizados en las neuronas del ganglio petroso. Ahora bien, dado que no hemos encontrado PIEZO1 en los nervios glómicos es de suponer que las neuronas PIEZO1 positivas del ganglio petroso proyectan sobre otros territorios del nervio glosofaríngeo distintos al cuerpo carotídeo.

El resto de las observaciones y hallazgos sobre TRPM8, TRPV4 y TRPV1 son completamente nuevos. Y teniendo en cuenta que aunque todos esos canales tienen un componente mecanosensorial evidente, también están implicados en otras funciones sensitivas por lo que, ante la ausencia de estudios fisiológicos y farmacológicos, cualquier propuesta de atribuirles una función es puramente especulativa. En base a los niveles de expresión puede considerarse a TRPV4 como un buen candidato a mecanosensor en el cuerpo carotídeo ya que detecta fuerzas mecánicas como la hinchazón osmótica, el estiramiento mecánico, el esfuerzo cortante y la rigidez de la ECM (Liedtke W y Friedman, 2003; Thodeti et al., 2009; Matthews et al., 2010; Adapala et al., 2013, 2016, 2020, 2021; Rahaman et al. 2014).

Y en cuanto a los hallazgos en el ganglio petroso nuestras observaciones están en línea con las de Hondoh et al. (2010), Shirahata et al. (2015), Hosshain et al. (2018) y Jawaid et al. (2022).

### 6.3. Limitaciones del estudio y futuras investigaciones

Los estudios sobre material humano se ven limitados por causas éticas ante la imposibilidad de realizar experimentación. Ello se ve aumentado si, como en el presente

estudio se trata de material procedente de cadáveres en los que la preservación del tejido, especialmente el cuerpo carotídeo, es crítica para poder obtener resultados idóneos. Aun así, los trabajos sobre muestras humanas siempre tienen la ventaja de que, si se analizan mediante las técnicas adecuadas, no necesitan de extrapolaciones de datos hacia el hombre como sucede cuando se trabaja *in vivo* o con otras especies animales.

A esa limitación general, cabe añadir que no es posible disponer un número amplio de piezas de estudio. Aunque existen histobancos y biobancos que disponen de material este no siempre se encuentra en las condiciones idóneas para realizar estudios de inmunohistoquímica, por alteraciones estructurales o por pérdida de la antigenicidad específica para algunos antígenos; a ello hay que sumar que no siempre el procesamiento de las piezas que se depositan en el histobanco es el más adecuado porque ha sufrido superfijación.

A pesar de las limitaciones indicadas y de los problemas técnicos sobrevenidos, en términos generales se han logrado con éxito los objetivos propuestos, ya que hemos localizado las mecanoproteínas investigadas (menos TRPM8) en los barorreceptores del seno carotídeo y en los nervios y células glómicas de tipo I y de tipo II. Además, se han detectado en las neuronas del ganglio sensitivo que supe a ambas formaciones.

En el presente trabajo de investigación nos hemos limitado a analizar la expresión en el seno carotídeo a algunas mecanoproteínas relacionadas con la mecanotransducción del barorreflejo. Pero el trabajo debería ser ampliado a situaciones en las que la presión arterial está elevada/disminuida de manera crónica o que existan diferencias mantenidas en el flujo arterial. La estructura y función de los terminales barorreceptores se ve alterada durante el envejecimiento y la hipertensión, y la disminución de la sensibilidad barorrefleja predice el riesgo de enfermedad arterial coronaria e insuficiencia cardíaca (La Rovere et al., 2008). Las alteraciones inducidas por la edad y la dieta en la sensibilidad barorrefleja pueden deberse al endurecimiento de la pared arterial elástica, así como a adaptaciones dentro de las neuronas periféricas y centrales que participan en el reflejo barorreceptor (Andresen et al., 1978; Wehrwein y Joyner, 2013). Por otro lado, La sensibilidad barorrefleja está disminuida en numerosos estados patológicos, incluyendo

hipertensión arterial crónica, insuficiencia cardíaca, obesidad y diabetes mellitus (Chapleau et al., 2001; Schultz et al., 2013, 2015; Limberg et al., 2015; Iturriaga et al., 2017; Conde et al., 2018; Sacramento et al., 2020; Felipe et al., 2023), y síndromes que asocian síntomas y signos de todas esas patologías como la apnea obstructiva del sueño (Prabhakar et al., 2020, 2023; Iturriaga et al., 2021). Por tanto, uno de los objetivos próximos a tratar de desarrollar será el estudio del seno carotídeo de pacientes con este tipo de patologías.

Finalmente, hay que comentar que, entre los experimentos inmediatos a realizar en esta línea de investigación, están los de establecer la expresión de los receptores para los diferentes neurotransmisores que participan en la neurotransmisión del cuerpo carotídeo. Además, teniendo en cuenta que en nuestros experimentos actuales y en los previos con los canales ASIC (Martínez-Barbero et al., 2023) hemos observado evidencias indirectas de que las células glómicas de tipo II expresan algunos canales iónicos tenemos como objetivo prioritario caracterizar cuáles son, porque ello abriría un campo nuevo de investigación al ser las células gliales sensores para diferentes estímulos. Para marcar las células de tipo II se utilizará la proteína S100, que marca la casi totalidad de las células gliales en el sistema nervioso periférico y en órganos como la médula de la glándula suprarrenal (ver Gonzalez-Martínez et al., 2003). Este mismo marcador se ha utilizado regularmente para identificar las células de tipo II en el cuerpo carotídeo (ver Otlyga et al., 2021).

# 7. Conclusiones



## 7. Conclusiones

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

- 1.- Las formaciones nerviosas sensitivas de la adventicia del seno carotídeo forman diferentes morfotipos de terminales barorreceptores que incluyen terminaciones libres, terminaciones en flor, terminaciones arborescentes y corpúsculos laminares simples y Ruffini-like.
- 2.- Los terminales barorreceptores expresan inmunorreacción para las mecanoproteínas PIEZO1, PIEZO2, TRPV1 y TRPV4, pero no para TRPM8. Por tanto, los barorreceptores carotídeos humanos pueden realizar mecanotransducción mediante esas mecanoproteínas.
- 3.- La capa muscular de las paredes de las arterias carótidas expresan inmunorreacción para PIEZO1.
- 4.- Las formaciones nerviosas sensitivas, tanto libres como organizadas, de las capas adventicia y muscular de las arterias carótidas expresan las mecanoproteínas PIEZO1, PIEZO2, TRPV1 y TRPV4.
- 5.- Las mecano proteínas PIEZO1 y PIEZO2 se expresan de manera irregular en el cuerpo carotídeo. Mientras PIEZO1 no está presente en los nervios y prácticamente tampoco en las células de tipo I, PIEZO2 se detecta en nervios, una subpoblaciones de células tipo I y en las células de tipo II. Este resultado atribuye indirectamente potencial mecanorreceptor a las células glómicas gliales de tipo II.
- 6.- Los canales iónicos multifuncionales TRPM8, TRPV1 y TRPV4 se expresa en los nervios, células de tipo I y células del tipo II del cuerpo carotídeo humano.

7.- Las neuronas del ganglio petroso con tamaños en el rango propio de las neuronas mecanorreceptoras expresan inmunorreacción para PIEZO1, PIEZO2, TRPM8, TRPV1 y TRPV4. En el ganglio simpático cervical superior, se detectó inmunorreacción en la mayoría de los somas neuronales para PIEZO1, PIEZO2, TRPV1 y TRPV4, y en menor proporción para TRPM8.



# 8. Bibliografía



## 8. Bibliografía

- Abdala AP, McBryde FD, Marina N, Hendy EB, Engelman ZJ, Fudim M, Sobotka PA, Gourine AV, Paton JF. Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat. *J Physiol* 2012; 590:4269-4277.
- Abe J, Hosokawa H, Okazawa M, Kandachi M, Sawada Y, Yamanaka K, Matsumura K, Kobayashi S. TRPM8 protein localization in trigeminal ganglion and taste papillae. *Mo. Brain Res.* 2005; 136:91-98.
- Abraira VE, Ginty DD. The sensory neurons of touch. *Neuron* 2013; 79: 618-639.
- Adapala RK, Katari V, Teegala LR, Thodeti S, Paruchuri S, Thodeti CK. TRPV4 mechanotransduction in Fibrosis. *Cells.* 2021; 10: 3053.
- Adapala RK, Thoppil RJ, Ghosh K, Cappelli H, Dudley AC, Paruchuri S, Keshamouni V, Klagsbrun M, Meszaros J.G., Chilian W.M., et al. Activation of mechanosensitive ion channel TRPV4 normalizes tumor vasculature and improves cancer therapy. *Oncogene.* 2016;35:314-322.
- Adapala RK, Kanugula AK, Paruchuri S, Chilian WM, Thodeti CK. TRPV4 deletion protects heart from myocardial infarction-induced adverse remodeling via modulation of cardiac fibroblast differentiation. *Basic Res. Cardiol.* 2020; 115:14.
- Adapala RK, Thoppil RJ, Luther DJ, Paruchuri S, Meszaros JG, Chilian WM, Thodeti CK. TRPV4 channels mediate cardiac fibroblast differentiation by integrating mechanical and soluble signals. *J Mol Cell Cardiol.* 2013; 54:45-52.
- Allison SJ. PIEZOs in baroreceptor reflex. *Nat Rev Nephrol.*, 2019; 15: 62.
- Alonso-González P, Cabo R, San José I, Gago A, Suazo IC, García-Suárez O, Cobo J, Vega JA. Human Digital Meissner Corpuscles Display Immunoreactivity for the Multifunctional Ion Channels Trpc6 and Trpv4. *Anat Rec (Hoboken).* 2017; 300:1022-1031.
- Andani R, Khan Y S. Anatomy, head and neck, carotid sinus, in *StatPearls*, (Treasure Island, FL: StatPearls Publishing). 2020.
- Andresen MC, Kunze DL. Nucleus tractus solitarius—gateway to neural circulatory control. *Annu Rev Physiol.* 1994; 56: 9-116.
- Arniges M, Vázquez E, Fernández-Fernández JM, Valverde MA. Swelling-activated Ca<sup>2+</sup> entry via TRPV4 channel is defective in cystic fibrosis airway epithelia. *J Biol Chem.* 2004; 279: 54062-54068.

- Aumonier FJ. Histological observations on the distribution of baroreceptors in the carotid and aortic regions of the rabbit, cat and dog. *Acta Anat. (Basel)* 1972; 82: 1-16.
- Bagriantsev SN, Gracheva EO, Gallagher PG. Piezo proteins: regulators of mechanosensation and other cellular processes. *J Biol Chem.* 2014; 289:31673-31681.
- Barnett S, Mulligan E, Wagerle LC, Lahiri S. Measurement of carotid body blood flow in cats by use of radioactive microspheres. *J Appl Physiol.* 1988; 65: 2484-2489.
- Belmonte C, Viana F. Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Mol Pain* 2008; 4, 14.
- Benarroch EE. The arterial baroreflex: functional organization and involvement in neurologic disease. *Neurology.* 2008; 71:1733-1738.
- Becker D, Bereiter-Hahn J, Jendrach M. Functional interaction of the cation channel transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) and actin in volume regulation. *Eur J Cell Biol.* 2009; 88:141-152.
- Bilgi C, Atalik K. Effects of blood viscoelasticity on pulsatile hemodynamics in arterial aneurysms. *J Nonnewtonian Fluid Mech.* 2020; 279: 104263.
- Bonvini SJ, Birrell MA, Grace MS, Maher SA, Adcock JJ, Wortley MA, Dubuis E, Ching YM, Ford AP, Shala F, Miralpeix M, Tarrason G, Smith JA, Belvisi MG. Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4 and airway sensory afferent activation: Role of adenosine triphosphate. *J Allergy Clin Immunol.* 2016; 138: 249-261.e12.
- Brown AM. Receptors under pressure. An update on baroreceptors. *Circ Res.* 1980; 46:1-10.
- Bryant D, McCormack E, Cardona JJ, Chaiyamoorn A, Shekhawat D, Reina F, Carrera A, Iwanaga J, Dumont AS, Tubbs RS. Histology and immunohistochemistry of the human carotid sinus nerve. *Anat Cell Biol.* 2023. doi: 10.5115/acb.23.084.
- Buniel MC, Schilling WP, Kunze DL. Distribution of transient receptor potential channels in the rat carotid chemosensory pathway. *J Comp Neurol.* 2003; 464: 404-413.
- Burke SD, Jordan J, Harrison DG, Karumanchi SA. Solving baroreceptor mystery: role of PIEZO ion channels. *J Am Soc Nephrol.* 2019; 30: 911-913.

- Chang RB, Strohlic DE, Williams EK, Umans BD, Liberles SD. Vagal sensory neuron subtypes that differentially control breathing. *Cell* 2015; 161: 622-633.
- Chapleau MW, Li Z, Meyrelles SS, Ma X, Abboud FM. Mechanisms determining the Physiology of baroreceptor afferents in health and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 940: 1-19.
- Cheng Z, Powley TL, Schwaber JS, Doyle FJ 3rd. A laser confocal microscopic study of vagal afferent innervation of rat aortic arch: chemoreceptors as well as baroreceptors. *J Auton Nerv Syst.* 1997; 67: 1-14.
- Chen Y, Williams SH, McNulty AL, Hong JH, Lee SH, Rothfus NE, Parekh PK, Moore C, Gereau RW 4th, Taylor AB, Wang F, Guilak F, Liedtke W. Temporomandibular joint pain: a critical role for Trpv4 in the trigeminal ganglion. *Pain.* 2013; 154:1295-304.
- Chen Y, Kanju P, Fang Q, Lee SH, Parekh PK, Lee W, Moore C, Brenner D, Gereau RW 4th, Wang F, Liedtke W. TRPV4 is necessary for trigeminal irritant pain and functions as a cellular formalin receptor. *Pain.* 2014; 155: 2662-2672.
- Chen CC, Wong CW. Neurosensory mechanotransduction through acid-sensing ion channels. *J Cell Mol Med.* 2013;17: 337-349.
- Chesler AT, Szczot M, Bharucha-Goebel D, Čeko M, Donkervoort S, Laubacher C, Hayes LH, Alter K, Zampieri C, Stanley C, Innes AM, Mah JK, Grosmann CM, Bradley N, Nguyen D, Foley AR, Le Pichon CE, Bönnemann CG. The Role of PIEZO2 in Human Mechanosensation. *N Engl J Med.* 2016; 375: 1355-1364.
- Ciriello J, Hochstenbach, S, Roder, S. Central Projections of Baroreceptor and Chemoreceptor Afferent Fibers in the Rat. In: Robin I, Barraco A, (eds). *Nucleus of the Solitary Tract.* Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 35-50.
- Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev.* 2005; 57: 427-450.
- 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.

- Conde SV, Sacramento JF, Melo BF, Fonseca-Pinto R, Romero-Ortega MI, Guarino MP. Blood Pressure Regulation by the Carotid Sinus Nerve: Clinical Implications for Carotid Body Neuromodulation. *Front Neurosci.* 2022;15: 725751.
- Coste B. [Piezo proteins form a new class of mechanically activated ion channels]. *Med Sc. (Paris).* 2012; 28 1056-1057.
- Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 2010; 330: 55-60.
- Dhaka A, Earley TJ, Watson J, Patapoutian A. Visualizing cold spots: TRPM8-expressing sensory neurons and their projections. *J. Neurosci.* 2008;8:566-575.
- Delany NS, Hurle M, Facer P, Alnadaf T, Plumpton C, Kinghorn I, See CG, Costigan M, Anand P, Woolf CJ, Crowther D, Sanseau P, Tate SN. Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2. *Physiol Genomics.* 2001; 4: 165-174.
- Delmas P, Coste B. Mechano-gated ion channels in sensory systems. *Cell.* 2013; 155:278-84.
- Delmas P, Parpaite T, Coste B. PIEZO channels and newcomers in the mammalian mechanosensitive ion channel family. *Neuron.* 2022; 110: 2713-2727.
- Del Rio R, Andrade DC, Lucero C, Arias P, Iturriaga R. Carotid Body Ablation Abrogates Hypertension and Autonomic Alterations Induced by Intermittent Hypoxia in Rats. *Hypertension.* 2016; 68:436-445.
- Di Giulio C. Ageing of the carotid body. *J Physiol.* 2018; 596: 3021-3027.
- Di Giulio C, Zara S, Mazzatenta A, Verratti V, Porzionato A, Cataldi A, Pokorski M. Aging and the carotid body: A scoping review. *Respir Physiol Neurobiol.* 2023; 313:104063.
- Douguet D, Honoré E. Mammalian Mechanoelectrical Transduction: Structure and Function of Force-Gated Ion Channels. *Cell.* 2019; 179: 340-354.
- Drummond HA, Price MP, Welsh MJ, Abboud FM. A molecular component of the arterial baroreceptor mechanotransducer. *Neuron.* 1998; 21: 1435-1441.

- Dubin AE, Murthy S, Lewis AH, Brosse L, Cahalan SM, Grandl J, Coste B, Patapoutian A. Endogenous Piezo1 can confound mechanically activated channel identification and characterization. *Neuron*. 2017;94:266-270.
- Ehmke H. The mechanotransduction of blood pressure. *Science* 2018; 362: 398-399.
- Eid SR, Cortright DN. Transient receptor potential channels on sensory nerves. *Handb Exp Pharmacol*. 2009; 194, 261-281.
- El Karim IA, Linden GJ, Curtis TM, About I, McGahon MK, Irwin CR, Killough SA, Lundy FT. Human dental pulp fibroblasts express the “cold-sensing” transient receptor potential channels TRPA1 and TRPM8. *J. Endod*. 2011; 37:473-478.
- Eyzaguirre C, Fidone SJ. Transduction mechanisms in carotid body: glomus cells, putative neurotransmitters, and nerve endings. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1980; 239: C135-C152.
- Felippe ISA, Zera T, da Silva MP, Moraes DJA, McBryde F, Paton JFR. The sympathetic nervous system exacerbates carotid body sensitivity in hypertension. *Cardiovasc Res*. 2023; 119: 316-331.
- Fidone SJ, Sato A. A study of chemoreceptor and baroreceptor A and C-fibres in the cat carotid nerve. *J Physiol*. 1969; 205: 527-548.
- Frinchi M, Di Liberto V, Turimella S, D'Antoni F, Theis M, Belluardo N, Mudò G. Connexin36 (Cx36) expression and protein detection in the mouse carotid body and myenteric plexus. *Acta Histochem*. 2013; 115: 252-256.
- Gao L, Bonilla-Henao V, García-Flores P, Arias-Mayenco I, Ortega-Sáenz P, López-Barneo J. Gene expression analyses reveal metabolic specifications in acute O<sub>2</sub>-sensing chemoreceptor cells. *J Physiol*. 2017; 595: 6091-6120.
- García-Mesa Y, García-Piqueras J, Cuendias P, Cobo R, Martín-Cruces J, Feito J, García-Suarez O, Biedma BM, Vega JA. Synaptophysin is a selective marker for axons in human cutaneous end organ complexes. *Ann Anat*. 2022; 243: 151955.
- Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R. Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol Rev*. 1994; 74: 829-898.
- Gonzalez-Martinez T, Perez-Piñera P, Díaz-Esnal B, Vega JA. S-100 proteins in the human peripheral nervous system. *Microsc Res Tech*. 2003; 60: 633-638.

- Gu JG, Berkowitz DE. Tentonin 3 as a baroreceptor mechanosensor: not a stretch. *J Clin Invest.* 2020; 130:3412-3415.
- Gu Y, Gu C. Physiological and pathological functions of mechanosensitive ion channels. *Mol Neurobiol.* 2014; 50: 339-347.
- Güler AD, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M, Caterina M. Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci.* 2002; 22: 6408-6414.
- Hellmich UA, Gaudet R. Structural biology of TRP channels. *Handb Exp Pharmacol.* 2014; 23:963-990.
- Hondoh A, Ishida Y, Ugawa S, Ueda T, Shibata Y, Yamada T, Shikano M, Murakami S, Shimada S. Distinct expression of cold receptors (TRPM8 and TRPA1) in the rat nodose-petrosal ganglion complex. *Brain Res.* 2010; 1319: 60-69.
- Hong GS, Lee B, Wee J, Chun H, Kim H, Jung J, Cha JY, Riew TR, Kim GH, Kim IB, Oh U. Tentonin 3/TMEM150c Confers Distinct Mechanosensitive Currents in Dorsal-Root Ganglion Neurons with Proprioceptive Function. *Neuron.* 2016; 91:107-118.
- Honore E, Martins JR, Penton D, Patel, A, Demolombe S. The piezo mechanosensitive ion channels: May the force be with you! *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2015; 169: 25-41.
- Hossain MZ, Ando H, Unno S, Masuda Y, Kitagawa J. Activation of TRPV1 and TRPM8 Channels in the Larynx and Associated Laryngopharyngeal Regions Facilitates the Swallowing Reflex. *Int J Mol Sci.* 2018; 19: 4113.
- Hossain MZ, Ando H, Unno S, Roy RR, Kitagawa J. Pharmacological activation of transient receptor potential vanilloid 4 promotes triggering of the swallowing reflex in rats. *Front Cell Neurosci.* 2023; 17:1149793.
- Huang H, Bae C, Sachs F, Suchyna TM. Caveolae regulation of mechanosensitive channel function in myotubes. *PLoS One.* 2013; 8:e72894.
- Ikeda R, Cha M, Ling J, Jia Z, Coyle D, Gu JG. Merkel cells transduce and encode tactile stimuli to drive A $\beta$ -afferent impulses. *Cell* 2014; 157:664-675.



- Iskander A, Bilgi C, Naftalovich R, Hacıhaliloglu I, Berkman T, Naftalovich D, Pahlevan N. The Rheology of the Carotid Sinus: A Path Toward Bioinspired Intervention. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021; 9: 678048.
- Iturriaga R, Alcayaga J. Neurotransmission in the carotid body: transmitters and modulators between glomus cells and petrosal ganglion nerve terminals. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004; 47: 46-53.
- Iturriaga R, Alcayaga J, Chapleau MW, Somers VK. Carotid body chemoreceptors: physiology, pathology, and implications for health and disease. *Physiol Rev.* 2021; 101: 1177-1235.
- Izquierdo C, Martín-Martínez M, Gómez-Monterrey I, González-Muñiz R. TRPM8 Channels: Advances in Structural Studies and Pharmacological Modulation. *Int J Mol Sci.* 2021; 22: 8502.
- Jawaid S, Herring AI, Getsy PM, Lewis SJ, Watanabe M, Kolesova H. Differential immunostaining patterns of transient receptor potential (TRP) ion channels in the rat nodose ganglion. *J Anat.* 2022; 241: 230-244.
- Jiang Y, Yang X, Jiang J, Xiao B. Structural Designs and Mechanogating Mechanisms of the Mechanosensitive Piezo Channels. *Trends Biochem Sci.* 2021; 46: 472-488.
- Jin P, Jan LY, Jan YN. Mechanosensitive Ion Channels: Structural Features Relevant to Mechanotransduction Mechanisms. *Annu Rev Neurosci.* 2020; 43: 207-229.
- Katayama PL, Castania JA, Dias DP, Patel KP, Fazan R Jr., Salgado HC. Role of chemoreceptor activation in hemodynamic responses to electrical stimulation of the carotid sinus in conscious rats. *Hypertension* 2015; 66 598-603.
- Kefauver JM, Ward AB, Patapoutian A. Discoveries in structure and physiology of mechanically activated ion channels. *Nature.* 2020; 587:567-576.
- Keh SM, Facer P, Yehia A, Sandhu G, Saleh HA, Anand P. The menthol and cold sensation receptor TRPM8 in normal human nasal mucosa and rhinitis. *Rhinology.* 2011; 49:11.
- Kim D, Kim I, Wang J, White C, Carroll JL. Hydrogen sulfide and hypoxia-induced changes in TASK (K2P3/9) activity and intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in rat carotid body glomus cells. *Respir Physiol Neurobiol.* 2015: 30-38.
- Kirchheim HR. Systemic arterial baroreceptor reflexes. *Physiol Rev.* 1976; 56: 100-177.

- Kolpakova J, Li L, Hatcher JT, Gu H, Zhang X, Chen J, Cheng ZJ. Responses of Nucleus Tractus Solitarius (NTS) early and late neurons to blood pressure changes in anesthetized F344 rats. *PLoS One*. 2017; 12(4):e0169529.
- Kougias P, Weakley SM, Yao Q, Lin PH, Chen C. Arterial baroreceptors in the management of systemic hypertension. *Med Sci Monit*. 2010;16: RA1RA8.
- Koyama Y, Coker RH, Stone EE, Lacy DB, Jabbour K, Williams PE, Wasserman DH. Evidence that carotid bodies play an important role in glucoregulation in vivo. *Diabetes*. 2000; 49: 1434-1442.
- Krauhs JM. Structure of rat aortic baroreceptors and their relationship to connective tissue. *J Neurocytol*. 1979; 8: 401-414.
- Kumada M, Terui N, Kuwaki T. Arterial baroreceptor reflex: its central and peripheral neural mechanisms. *Prog Neurobiol*. 1995; 35: 331-361.
- Kumar P, Prabhakar NR. Peripheral chemoreceptors: function and plasticity of the carotid body. *Compr Physiol*. 2012; 2: 141-219.
- La Rovere MT, Pinna GD, Raczak G. Baroreflex sensitivity: measurement and clinical implications. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2008; 13: 191-207.
- Lee U Y, Kim C I, Chung G H, Jung J, Kwak H S. Hemodynamic changes in the carotid artery after infusion of normal saline using computational fluid dynamics. *Diagnostics (Basel)* 2020; 10:473.
- Li J, Hou B, Tumova S, Muraki K, Bruns A, Ludlow MJ, Sedo A, Hyman AJ, McKeown L, Young RS, Yuldasheva NY, Majeed Y, Wilson LA, Rode B, Bailey MA, Kim HR, Fu Z, Carter DA, Bilton J, Imrie H, Ajuh P, Dear TN, Cubbon RM, Kearney MT, Prasad RK, Evans PC, Ainscough JF, Beech DJ. Piezo1 integration of vascular architecture with physiological force. *Nature*. 2014; 515: 279-282.
- Liedtke WB. TRPV channels' function in osmo- and mechanotransduction. In: Liedtke WB, Heller S (Eds.), *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. CRC Press, Boca Raton, FL. 2007.
- Liedtke W, Choe Y, Martí-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, Heller S. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell*. 2000; 103: 525-535.

- Liedtke W, Friedman JM. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*<sup>-/-</sup> mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 13698-13703.
- Liedtke W, Kim C. Functionality of the TRPV subfamily of TRP ion channels: add mechano-TRP and osmo-TRP to the lexicon! *Cell Mol Life Sci*. 2005; 62: 2985-3001.
- Limberg JK, Dube S, Kuijpers M, Farni KE, Basu A, Rizza RA, Curry TB, Basu R, Joyner MJ. Effect of hypoxia on heart rate variability and baroreflex sensitivity during hypoglycemia in type 1 diabetes mellitus. *Clin Auton Res*. 2015; 25: 243-250.
- López-Barneo J. Oxygen sensing and stem cell activation in the hypoxic carotid body. *Cell Tissue Res*. 2018; 372: 417-425.
- López-Barneo J, Ortega-Sáenz P, González-Rodríguez P, Fernández-Agüera MC, Macías D, Pardal R, Gao L. Oxygen-sensing by arterial chemoreceptors: Mechanisms and medical translation. *Mol Aspects Med*. 2016; 47-48: 90-108.
- Loukin SH, Su Z, Kung C. Hypotonic shocks activate rat TRPV4 in yeast in the absence of polyunsaturated fatty acids. *FEBS Lett*. 2009; 583: 754-758.
- Lu D, Kassab G S. Role of shear stress and stretch in vascular mechanobiology. *J R Soc Interface*. 2011; 8: 1379-1385.
- Lu Y, Ma X, Sabharwal R, Snitsarev V, Morgan D, Rahmouni K, Drummond HA, Whiteis CA, Costa V, Price M, Benson C, Welsh MJ, Chapleau MW, Abboud FM. The ion channel ASIC2 is required for baroreceptor and autonomic control of the circulation. *Neuron*. 2009; 64: 885-897.
- Lu HJ, Nguyen TL, Hong GS, Pak S, Kim H, Kim H, Kim DY, Kim SY, Shen Y, Ryu PD, Lee MO, Oh U. Tentonin 3/TMEM150C senses blood pressure changes in the aortic arch. *J Clin Invest*. 2020; 130: 3671-3683.
- Lu Y, Whiteis CA, Sluka KA, Chapleau MW, Abboud FM. Responses of glomus cells to hypoxia and acidosis are uncoupled, reciprocal and linked to ASIC3 expression: selectivity of chemosensory transduction. *J Physiol*. 2013; 591: 919-932.
- Lumpkin EA, Caterina MJ. Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature*. 2007; 445: 858-65.

- 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.
- Martinac B. The ion channels to cytoskeleton connection as potential mechanism of mechanosensitivity. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1838:682-691.
- Martinac B, Poole K. Mechanically activated ion channels. *Int J Biochem Cell Biol*. 2018; 97:104-107.
- Marshall JM. Chemoreceptors and cardiovascular control in acute and chronic systemic hypoxia. *Braz J Med Biol Res*. 1998; 31 863-888.
- Martínez Barbero G. Canales iónicos ASIC en el cuerpo carotídeo. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo, 2023.
- Martínez-Barbero G, García-Mesa Y, Cobo R, Cuendias P, Martín-Biedma B, GARCÍA-Suarez O, Feito J, Cobo T, Vega JA. Acid-sensing ion channels immunoreactivity in nerve profiles and glomus cells of the human carotid body. *Int J Mol Sci*. 2023; 24: 17161.
- Matthews BD, Thodeti CK, Tytell J, Mammoto A, Overby D, Ingber DE. Ultra-rapid activation of TRPV4 ion channels by mechanical forces applied to cell surface  $\beta$ 1 integrins. *Integr Biol*. 2010;2:435-442.
- Matthews BD, Thodeti CK, Tytell JD, Mammoto A, Overby DR, Ingber DE. Ultra-rapid activation of TRPV4 ion channels by mechanical forces applied to cell surface beta1 integrins. *Integr Biol (Camb)*. 2010; 2: 435-442.
- McBryde FD, Abdala AP, Hendy EB, Pijacka W, Marvar P, Moraes DJ, Sobotka PA, Paton JF. The carotid body as a putative therapeutic target for the treatment of neurogenic hypertension. *Nat Commun* 2013; 4: 2395.
- McBryde FD, Hart EC, Ramchandra R, Paton JFR. Evaluating the carotid bodies and renal nerves as therapeutic targets for hypertension. *Auton Neurosci*. 2017; 204:126-130.
- McDonald DM, Mitchell RA. The innervation of glomus cells, ganglion cells and blood vessels in the rat carotid body: a quantitative ultrastructural analysis. *J Neurocytol*. 1975; 4: 177-230.

- Meng F, Sachs F. Measuring strain of structural proteins in vivo in real time. En: Kohl P, Sachs F, Franz MR, editors. Cardiac Mechano-Electric Coupling and Arrhythmia: From Pipette to Patient. Oxford: Oxford University Press; 2011. pp. 431-434.
- Miglis MG, Muppidi S. Ion channels PIEZOs identified as the long-sought baroreceptor mechanosensors for blood pressure control, and other updates on autonomic research. Clin Auton Res. 2019; 29: 9-11.
- Min S, Chang RB, Prescott SL, Beeler B, Joshi NR, Strohlic DE, Liberles SD. Arterial Baroreceptors Sense Blood Pressure through Decorated Aortic Claws. Cell Rep. 2019; 29: 2192-2201.e3.
- Moe P, Blount P. Assessment of potential stimuli for mechano-dependent gating of MscL: effects of pressure, tension, and lipid headgroups. Biochemistry. 2005; 44:12239-12244.
- Moore C, Liedtke WB. Osmomechanical-Sensitive TRPV Channels in Mammals. In: *Neurobiology of TRP Channels*. Chapter 5. Emir TLR, editor. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2017.
- Munster A B, Thapar A, Davies A H. History of carotid stroke. Stroke. 2016; 47 e66-e69.
- Murali S, Nurse CA. Purinergic signalling mediates bidirectional crosstalk between chemoreceptor type I and glial-like type II cells of the rat carotid body. J Physiol. 2016; 594: 391-406.
- Murthy SE, Dubin AE, Patapoutian A. Piezos thrive under pressure: mechanically activated ion channels in health and disease. Nat Rev Mol Cell Biol. 2017; 18:771-783.
- Nakayama K. Surgical removal of the carotid body for bronchial asthma. Aust N Z J Surg. 1962; 31:214-221.
- Nguyen K T, Clark C D, Chancellor T J, Papavassiliou D V. Carotid geometry effects on blood flow and on risk for vascular disease. J Biomech. 2008; 41: 11-19.
- Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. Genome Biol. 2011; 12, 218.
- Nilius B, Szallasi A. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the Ranade SS, Syeda R, Patapoutian A. Mechanically Activated Ion Channels. Neuron. 2015; 87:1162-1179.

- Nonomura K, Woo SH, Chang RB, Gillich A, Qiu Z, Francisco AG, Ranade SS, Liberles SD, Patapoutian A. Piezo2 senses airway stretch and mediates lung inflation-induced apnoea. *Nature*. 2017; 541: 176-181.
- Nurse CA. Neurotransmission and neuromodulation in the chemosensory carotid body. *Auton Neurosci*. 2005; 120: 1-9.
- Nurse CA. Synaptic and paracrine mechanisms at carotid body arterial chemoreceptors. *J Physiol*. 2014; 592: 3419-3426.
- Nurse CA, Leonard EM, Salman S. Role of glial-like type II cells as paracrine modulators of carotid body chemoreception. *Physiol Genomics*. 2018; 50: 255-262.
- Ortega-Sáenz P, López-Barneo J. Physiology of the Carotid Body: From Molecules to Disease. *Annu Rev Physiol*. 2020; 82:127-149.
- Ortega-Sáenz P, Pardal R, Levitsky K, Villadiego J, Muñoz-Manchado AB, Durán R, Bonilla-Henao V, Arias-Mayenco I, Sobrino V, Ordóñez A, Oliver M, Toledo-Aral JJ, López-Barneo J. Cellular properties and chemosensory responses of the human carotid body. *J Physiol*. 2013; 591: 6157-6173.
- Otlyga D, Tsvetkova E, Junemann O, Saveliev S. Immunohistochemical Characteristics of the Human Carotid Body in the Antenatal and Postnatal Periods of Development. *Int J Mol Sci*. 2021; 22: 8222.
- Prabhakar NR, Peng YJ, Nanduri J. Hypoxia-inducible factors and obstructive sleep apnea. *J Clin Invest*. 2020; 130: 5042-5051.
- Prabhakar NR, Peng YJ, Nanduri J. Carotid body hypersensitivity in intermittent hypoxia and obstructive sleep apnoea. *J Physiol*. 2023. doi: 10.1113/JP284111.
- Pardal R, López-Barneo J. Low glucose-sensing cells in the carotid body. *Nat Neurosci*. 2002; 5: 197-198.
- Pardal R, Ortega-Sáenz P, Durán R, López-Barneo J. Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell* 2007; 131: 364-377.
- Parpaite T, Brosse L, Séjourné N, Laur A, Mechioukhi Y, Delmas P, Coste B. Patch-seq of mouse DRG neurons reveals candidate genes for specific mechanosensory functions. *Cell Rep*. 2021; 37:109914.

- Parra A, Madrid R, Echevarria D, Del Olmo S, Morenilla-Palao C, Acosta MC, Gallar J, Dhaka A, Viana F, Belmonte C. Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nat Med*. 2010; 16:1396-1399.
- Paton JF, Sobotka PA, Fudim M, Engelman ZJ, Hart EC, McBryde FD, Abdala AP, Marina N, Gourine AV, Lobo M, Patel N, Burchell A, Ratcliffe L, Nightingale A. The carotid body as a therapeutic target for the treatment of sympathetically mediated diseases. *Hypertension*. 2013; 61: 5-13.
- Persson P B, Kirchheim H R. *Baroreceptor Reflexes: Integrative Functions and Clinical Aspects*. New York, NY: Springer-Verlag. 1991.
- Phan MN, Leddy HA, Votta BJ, Kumar S, Levy DS, Lipshutz DB, Lee SH, Liedtke W, Guilak F. Functional characterization of TRPV4 as an osmotically sensitive ion channel in porcine articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2009; 60: 3028-3037.
- Pijacka W, McBryde FD, Marvar PJ, Lincevicius GS, Abdala AP, Woodward L, Li D, Paterson DJ, Paton JF. Carotid sinus denervation ameliorates renovascular hypertension in adult Wistar rats. *J Physiol* 2016; 594:6255-6266.
- Platero-Luengo A, González-Granero S, Durán R, Díaz-Castro B, Piruat JI, García-Verdugo JM, Pardal R, López-Barneo J. An O<sub>2</sub>-sensitive glomus cell-stem cell synapse induces carotid body growth in chronic hypoxia. *Cell* 2014;156: 291-303.
- Porzionato A, Macchi V, Stecco C, De Caro R. The Carotid Sinus Nerve-Structure, Function, and Clinical Implications. *Anat Rec (Hoboken)*. 2019; 302: 575-587.
- Prabhakar NR. Sensing hypoxia: physiology, genetics and epigenetics. *J Physiol* 2013; 591:2245-2257.
- Rahaman SO, Grove LM, Paruchuri S, Southern BD, Abraham S, Niese KA, Scheraga RG, Ghosh S, Thodeti CK, Zhang DX, Moran MM, Schilling WP, Tschumperlin DJ, Olman MA. TRPV4 mediates myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis in mice. *J Clin Invest*. 2014; 124: 5225-5238.
- Ranade SS, Syeda R, Patapoutian A. Mechanically Activated Ion Channels. *Neuron*. 2015; 87:1162-1179.
- Ranade SS, Woo SH, Dubin AE, Moshourab RA, Wetzel C, Petrus M, Mathur J, Bégay V, Coste B, Mainquist J, Wilson AJ, Francisco AG, Reddy K, Qiu Z, Wood JN, Lewin GR,

- Patapoutian A. Piezo2 is the major transducer of mechanical forces for touch sensation in mice. *Nature*. 2014; 516:121-5.
- Reeh PW, Fischer MJM. Nobel somatosensations and pain. *Pflugers Arch*. 2022; 474: 405-420.
- Rees PM. Electron microscopical observations on the architecture of the carotid arterial walls, with special reference to the sinus portion. *J Anat*. 1968; 103: 35-47.
- Retailleau K, Duprat F, Arhatte M, Ranade SS, Peyronnet R, Martins JR, Jodar M, Moro C, Offermanns S, Feng Y, Demolombe S, Patel A, Honoré E. Piezo1 in Smooth Muscle Cells Is Involved in Hypertension-Dependent Arterial Remodeling. *Cell Rep*. 2015; 13: 1161-1171.
- Ridone P, Vassalli M, Martinac B. Piezo1 mechanosensitive channels: what are they and why are they important. *Biophys Rev*. 2019; 11: 795-805.
- Ryskamp DA, Frye AM, Phuong TT, Yarishkin O, Jo AO, Xu Y, Lakk M, Iuso A, Redmon SN, Ambati B, Hageman G, Prestwich GD, Torrejon KY, Križaj D. TRPV4 regulates calcium homeostasis, cytoskeletal remodeling, conventional outflow and intraocular pressure in the mammalian eye. *Sci Rep*. 2016; 6:30583.
- Rode B, Shi J, Endesh N, Drinkhill MJ, Webster PJ, Lotteau SJ, Bailey MA, Yuldasheva NY, Ludlow MJ, Cubbon RM, Li J, Futers TS, Morley L, Gaunt HJ, Marszalek K, Viswambharan H, Cuthbertson K, Baxter PD, Foster R, Sukumar P, Weightman A, Calaghan SC, Wheatcroft SB, Kearney MT, Beech DJ. Piezo1 channels sense whole body physical activity to reset cardiovascular homeostasis and enhance performance. *Nat Commun*. 2017; 8: 350.
- Rogers RF, Rose WC, Schwaber JS. Simultaneous encoding of carotid sinus pressure and  $dP/dt$  by NTS target neurons of myelinated baroreceptors. *J Neurophysiol* 1996; 76: 2644-2660.
- Rogers RF, Paton JF, Schwaber JS. NTS neuronal responses to arterial pressure and pressure changes in the rat. *Am J Physiol* 1993;265:R1355-1368.
- Sacramento JF, Andrzejewski K, Melo BF, Ribeiro MJ, Obeso A, Conde SV. Exploring the Mediators that Promote Carotid Body Dysfunction in Type 2 Diabetes and Obesity Related Syndromes. *Int J Mol Sci*. 2020; 21: 5545.



- Samanta A, Hughes TET, Moiseenkova-Bell VY. Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *Subcell Biochem.* 2018; 87: 141-165.
- Sato T, Fujita M, Kano M, Hosokawa H, Kondo T, Suzuki T, Kasahara E, Shoji N, Sasano T, Ichikawa H. The distribution of transient receptor potential melastatin-8 in the rat soft palate, epiglottis, and pharynx. *Cell Mol Neurobiol.* 2013; 33:161-165.
- Schild JH, Kunze DL. Differential distribution of voltage-gated channels in myelinated and unmyelinated baroreceptor afferents. *Auton Neurosci.* 2012; 172: 4-12.
- Schultz HD, Marcus NJ, Del Rio R. Role of the carotid body in the pathophysiology of heart failure. *Curr Hypertens Rep.* 2013; 15: 356-362.
- Schultz HD, Marcus NJ, Del Rio R. Role of the Carotid Body Chemoreflex in the Pathophysiology of Heart Failure: A Perspective from Animal Studies. *Adv Exp Med Biol.* 2015; 860:167-185.
- Seagard JL, Brederode JF van, Dean C, Hopp FA, Gallenberg LA, Kampine JP. Firing characteristics of single-fiber carotid sinus baroreceptors. *Circ Res.* 1990; 66: 1499-1509.
- Seagard JL, Hopp FA, Drummond HA, Van Wynsberghe DM. Selective contribution of two types of carotid sinus baroreceptors to the control of blood pressure. *Circ Res.* 1993; 72:1011-1022.
- Sharif-Naeini R. Contribution of mechanosensitive ion channels to somatosensation. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015;131: 53-71.
- Shin MK, Eraso CC, Mu YP, Gu C, Yeung BHY, Kim LJ, Liu XR, Wu ZJ, Paudel O, Pichard LE, Shirahata M, Tang WY, Sham JSK, Polotsky VY. Leptin Induces Hypertension Acting on Transient Receptor Potential Melastatin 7 Channel in the Carotid Body. *Circ Res* 2019;125: 989-1002.
- Shin MK, Yao Q, Jun JC, Bevans-Fonti S, Yoo DY, Han W, Mesarwi O, Richardson R, Fu YY, Pasricha PJ, Schwartz AR, Shirahata M, Polotsky VY. Carotid body denervation prevents fasting hyperglycemia during chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol (1985).* 2014; 117: 765-776.
- Shirahata M, Tang WY, Shin MK, Polotsky VY. Is the carotid body a metabolic monitor? *Adv Exp Med Biol.* 2015; 860: 153-159.

- Soattin L, Fiore M, Gavazzo P, Viti F, Facci P, Raiteri R, Difato F, Pusch M, Vassalli M. The biophysics of piezo1 and piezo2 mechanosensitive channels. *Biophys Chem.* 2016; 208:26-33.
- Spyer KM. Neural mechanisms involved in cardiovascular control during affective behaviour. *Trends Neurosci.* 1989;12: 506-513.
- Stocker SD, Sved AF, Andresen MC. Missing pieces of the Piezo1/Piezo2 baroreceptor hypothesis: an autonomic perspective. *J Neurophysiol.* 2019; 122: 1207-1212.
- Suchyna TM, Markin VS, Sachs F. Biophysics and structure of the patch and the gigaseal. *Biophys J.* 2009; 97:738-47.
- Suchyna TM, Sachs F. Mechanosensitive channel properties and membrane mechanics in mouse dystrophic myotubes. *J Physiol.* 2007; 581:369-87.
- Suchyna T, Sachs F. The Membrane/Cytoskeleton Interface and Stretch-Activated Channels. In: Kohl P, Sachs F, Franz MR, editors. *Cardiac Mechano-Electric Coupling and Arrhythmia: From Pipette to Patient.* Oxford, UK: Oxford University Press; 2011. pp. 57-65.
- Sukharev S, Sachs F. Molecular force transduction by ion channels – diversity and unifying principles. *J Cell Sci.* 2012; 125: 3075-3083.
- Taberner FJ, Prato V, Schaefer I, Schrenk-Siemens K, Heppenstall PA, Lechner SG. Structure-guided examination of the mechanogating mechanism of PIEZO2. *Proc Natl Acad Sc. USA* 2019; 116: 14260-14269.
- Thakkar P, Pauza AG, Murphy D, Paton JFR. Carotid body: an emerging target for cardiometabolic co-morbidities. *Exp Physiol.* 2023; 108: 661-671.
- Taruno A. ATP Release Channels. *Int J Mol Sci.* 2018; 19: 808.
- Tazawa K, Ikeda H, Kawashima N, Okiji T. Transient receptor potential melastatin (TRPM) 8 is expressed in freshly isolated native human odontoblasts. *Arch. Oral Biol.* 2017; 75:55-61.
- Thodeti CK, Matthews B, Ravi A, Mammoto A, Ghosh K, Bracha AL, Ingber DE. TRPV4 Channels Mediate Cyclic Strain-Induced Endothelial Cell Reorientation Through Integrin-to-Integrin Signaling. *Circ Res.* 2009;104:1123-1130.

- Thakore P, Brain SD, Beech DJ. Correspondence: Challenging a proposed role for TRPC5 in aortic baroreceptor pressure-sensing. *Nat Commun.* 2018; 9: 1245.
- Toft-Bertelsen TL, MacAulay N. TRPing on Cell Swelling - TRPV4 Senses It. *Front Immunol.* 2021; 12: 730982.
- Vega JA, García-Suárez O, Montaña JA, Pardo B, Cobo JM. The Meissner and Pacinian sensory corpuscles revisited new data from the last decade. *Microsc Res Tech.* 2009; 72: 299-309.
- Wang L, Zhou H, Zhang M, Liu W, Deng T, Zhao Q, Li Y, Lei J, Li X, Xiao B. Structure and mechanogating of the mammalian tactile channel PIEZO2. *Nature* 2019; 573: 225-229.
- Wang S, Chennupati R, Kaur H, Iring A, Wettschureck N, Offermanns S. Endothelial cation channel PIEZO1 controls blood pressure by mediating flow-induced ATP release. *J Clin Invest.* 2016; 126: 4527-4536.
- Wehrwein EA, Basu R, Basu A, Curry TB, Rizza RA, Joyner MJ. Hyperoxia blunts counterregulation during hypoglycaemia in humans: possible role for the carotid bodies? *J Physiol.* 2010; 588(Pt 22): 4593-4601.
- Wehrwein EA, Joyner MJ. Regulation of blood pressure by the arterial baroreflex and autonomic nervous system. *Handb Clin Neurol.* 2013; 117: 89-102.
- Wilson-Pauwels L, Stewart PA, Spacey SD, Alekson EJ. *Cranial nerves; function and disfunction* (3<sup>rd</sup> Edition), Pmph USA. 2010.
- 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;18:1756-162.
- Wu J, Lewis AH, Grandl J. Touch, Tension, and Transduction - The Function and Regulation of Piezo Ion Channels. *Trends Biochem Sci.* 2017; 42:57-71.
- Yang H, Tenorio Lopes L, Barioni NO, Roeske J, Incognito AV, Baker J, Raj SR, Wilson RJA. The molecular makeup of peripheral and central baroreceptors: stretching a role for Transient Receptor Potential (TRP), Epithelial Sodium Channel (ENaC), Acid Sensing Ion Channel (ASIC), and Piezo channels. *Cardiovasc Res.* 2022; 118: 3052-3070.

- Yan X, Zhang S, Zhao H, Liu P, Huang H, Niu W, Wang W, Zhang C. ASIC2 Synergizes with TRPV1 in the Mechano-Electrical Transduction of Arterial Baroreceptors. *Neurosci Bull.* 2021; 37:1381-1396.
- Young M, Lewis AH, Grandl J. Physics of mechanotransduction by Piezo ion channels. *J Gen Physiol.* 2022; 154:e202113044.
- Zaelzer C, Hua P, Prager-Khoutorsky M, Ciura S, Voisin DL, Liedtke W, Bourque CW.  $\Delta$ N-TRPV1: A Molecular Co-detector of Body Temperature and Osmotic Stress. *Cell Rep.* 2015; 13: 23-30.
- Zeng WZ, Marshall KL, Min S, Daou I, Chappleau MW, Abboud FM, Liberles SD, Patapoutian A. PIEZOs mediate neuronal sensing of blood pressure and the baroreceptor reflex. *Science.* 2018; 362: 464-467.
- Zera T, Moraes DJA, da Silva MP, Fisher JP, Paton JFR. The Logic of Carotid Body Connectivity to the Brain. *Physiology (Bethesda).* 2019; 34:264-282.
- Zhang M, Buttigieg J, Nurse CA. Neurotransmitter mechanisms mediating low-glucose signalling in cocultures and fresh tissue slices of rat carotid body. *J Physiol.* 2007; 578 (Pt 3): 735-350.
- Zhao Q, Zhou H, Chi S, Wang Y, Wang J, Geng J, Wu K, Liu W, Zhang T, Dong MQ, Wang J, Li X, Xiao B. Structure and mechanogating mechanism of the Piezo1 channel. *Nature* 2018; 554: 487-492.
- Zimmer H G. Heinrich Ewald Hering and the carotid sinus reflex. *Clin. Cardiol.* 2004; 27: 485486.



# Anexo 1- Curriculum Vitae

Se adjunta en documento independiente



# Anexo 2- Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral

Artículo aceptado en *International Journal of Molecular Sciences*

**Journal Rank:** JCR - Q1 (*Biochemistry & Molecular Biology*)

**Impact factor:** 5,6



International Journal of  
*Molecular Sciences*



*Article*

EXPRESSION OF MECHANOGATED ION CHANNELS IN THE HUMAN CAROTID SINUS AND CAROTID BODY: distribution of PIEZO1, PIEZO2, TRPM8, TRPV1 and TRPV4

Elda Alba<sup>1</sup>, Yolanda García-Mesa<sup>1</sup>, Patricia Cuendias<sup>1</sup>, Ramón Cobo<sup>2</sup>, Olivia García-Suarez<sup>1</sup>, José A. Vega<sup>1,3</sup> and Teresa Cobo<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Morfología y Biología Celular, Grupo SINPOS, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, Spain

<sup>2</sup>Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario “Marqués de Valdecilla”, Santander, Spain

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Chile, Providencia – Area metropolitana, Santiago de Chile, Chile

<sup>4</sup>Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas, Universidad de Oviedo, Spain

<sup>5</sup>Instituto Asturiano de Odontología, Oviedo, Spain