



Universidad de Oviedo

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

PROGRAMA DE DOCTORADO

CIENCIAS DE LA SALUD

Órganos de los sentidos y Sistema Nervioso Periférico

Tesis Doctoral

BASES MOLECULARES DE LA PROPIOCEPCION

Simón Ordoñez González

Oviedo 2023

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

PROGRAMA DE DOCTORADO

CIENCIAS DE LA SALUD

Órganos de los sentidos y Sistema Nervioso Periférico

Tesis Doctoral

BASES MOLECULARES DE LA PROPIOCEPCION

Simón Ordóñez González

Directores

José A. Vega Álvarez

Tania Fontanil López

Oviedo 2023



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis Doctoral	
Español: BASES MOLECULARES DE LA PROPIOCEPCION	Inglés: MOLECULAR BASIS FOR PROPRIOCEPTION

2.- Autor	
Nombre: SIMON ORDOÑEZ GONZALEZ	
Programa de Doctorado: CIENCIAS DE LA SALUD Línea de Investigación: ORGANOS DE LOS SENTIDOS Y SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO	
Órgano responsable: CENTRO INTERNACIONAL DE POSTGRADO	

RESUMEN

Introducción y estado del arte. La propiocepción es el sentido de la posición y el movimiento. Está mediado por propioceptores, un pequeño subconjunto de neuronas mecanosensoriales localizadas en los ganglios raquídeos que transmiten información sobre el estiramiento y la tensión de los músculos, tendones y articulaciones. Estas neuronas suministran inervación aferente a órganos sensoriales especializados en músculos (husos musculares) y tendones (órganos tendinosos de Golgi). Una vez que se realiza la mecanotransducción, la información originada en los propioceptores viaja a través de dos vías nerviosas principales que llegan al sistema nervioso central a nivel de la médula espinal y el cerebelo (inconsciente) y la corteza cerebral (consciente) para su procesamiento. Por otro lado, dado que los estímulos para los propioceptores son mecánicos (estiramiento, tensión), la propiocepción puede considerarse como una modalidad de mecanosensibilidad y los supuestos mecanotransductores deben ser canales iónicos mecanosensibles. Hasta la fecha, en modelos experimentales se han propuesto como candidatos el canal iónico sensible al ácido 2 (ASIC2), el canal iónico de receptor de potencial transitorio vanilloide 4 (TRPV4) y PIEZO2, pero todos los estudios han sido realizados en modelos murinos y no existen datos en humanos.

Hipótesis y objetivos. **Hipótesis:** Los músculos esqueléticos humanos, como en el resto de los mamíferos, expresan canales iónicos de las familias ASIC y Piezo a nivel de los propioceptores, su sistema nervioso sensitivo intramuscular, especialmente en los husos neuromusculares, e intratendinoso, en los órganos tendinosos de Golgi. **Objetivos:** El **objetivo general** del estudio es contribuir al conocimiento de las bases de la propiocepción del sistema músculo-esquelético humano. Los **objetivos específicos** son los siguientes: 1.- Estudiar los husos neuromusculares y órganos tendinosos en los músculos esqueléticos humanos que son particularmente ricos en estas formaciones: los músculos lumbricales e interóseos de la mano; 2.- Determinar los patrones de expresión de las mecanoproteínas PIEZO1, PIEZO2 y ASIC2 en los husos neuromusculares y órganos tendinosos de Golgi; 3.- Ver si algunas de las mecanoproteínas investigadas se co-expresa en los receptores de propiocepción musculares.

Material y técnicas. Se utilizó material humano procedente de cadáveres fijados y piezas cadavéricas criopreservadas, no fijadas, obtenidas en el Área de Anatomía y Embriología Humana de la Universidad de Oviedo. Las piezas cadavéricas correspondían a 7 varones y 5 mujeres, de edades comprendidas entre los 61 y 83 años. De todos ellos se obtuvieron 3 músculos lumbricales, 2 músculos interóseos dorsales y 2 músculos interoseos palmares (n = 84). El material criopreservado y fresco fue lavado en una solución salina fría, dividido en segmentos y fijado durante 48 h en formol al 10% tamponado y posteriormente procesado de forma rutinaria para su inclusión en parafina. En el estudio se incluyeron en ganglios raquídeos cervicales humanos (n = 8) procedentes del Biobanco del grupo de investigación acreditado SINPOS

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

Se realizaron técnicas estructurales, de inmunohistoquímica por el método PAP y de inmunofluorescencia acoplada a microscopía laser confocal utilizando los anticuerpos de la siguiente tabla:

Antígeno	Especie	Dilución	Obtenido de
PIEZO1	Conejo	1:200	Alomone ¹
PIEZO2	Conejo	1:200	Sigma-Aldrich ²
ASIC2	Conejo	1:200	Lifespan Biosciences ³
NSE (clone BBS/NC/VI-H14)	Ratón	1:500	Dako ⁴
NFP (clone 2F11)	Ratón	1:200	Roche ⁵
Sinaptofisina (clone 27G12)	Ratón	Prediluido	Leica Biosystems ⁶
S100 P	Ratón	1:500	Dako ⁴
PaV (clone C12)	Ratón	1:200	ThermoFisher ⁷

¹Jerusalem, Israel; ²Saint Louis, MS, USA; ³Seattle, WA, USA; ⁴Glostrup, Denmark; ⁵Viena, Austria; ⁶Madrid, Spain; ⁷

ASIC2: hecho contra un péptido sintético, humano específico.

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: VFGFWAFGKHSAAADITSSLSQVPGPFLVMVLIQFGT MVVD RALYLRK

En las preparaciones de ganglios raquídeos se realizó un análisis de imágenes cuantitativo utilizando un sistema automático de análisis de imágenes (Quantimet 550, Leica, Programa QWIN). Se evaluó el porcentaje y tamaño (diámetro medio en μm) de las neuronas inmunorreactivas, evaluando cinco campos seleccionados al azar por sección (2,5 mm²). Para la evaluación del tamaño del cuerpo celular solo se consideraron los perfiles neuronales con núcleos aparentes, y las neuronas se dividieron en 7 clases de tamaño, medidas en pasos de 10 μm de diámetro.

Resultados y discusión. Los husos neuromusculares localizados en los músculos lumbricales e interóseos de la mano humana están formados por un numero variable de fibras intrafusales. El aparato nervioso que los supe (terminaciones anulo-espinales y terminaciones en flor) expresan inmunorreacción para la parvalbumina y la sinaptofisina sin que se aprecien diferencias entre los diferentes músculos ni relacionadas con la edad. De las mecanoproteínas analizadas PIEZO2 y ASIC2 se detectan en las fibras nerviosas de intrafusales, mientras que PIEZO1 está presente en fibras nerviosas intrafusales que no forman terminaciones típicas. Las imágenes no sugieren la presencia de mecanoproteínas en las placas motoras de los husos.

En cuanto a los propioceptores de los ganglios raquídeos cervicales, la distribución de las neuronas en los rangos de edad preestablecidos, sugiere representan en torno al 18%; esta subpoblacion neuronas sensitiva primaria fue parvalbumina (+). En todos ellos se detectó inmunorreacción para las mecanoproteínas estudiadas (Tabla).

	<10 μm	11-20 μm	21-30 μm	31-40 μm	41-50 μm	51-60 μm	>60 μm
Distribución	6	31	26	19	8	6	4
PaV	0	0	3	11	6	6	4
PIEZO1	4	27	25	17	7	6	3
PIEZO2	1	13	25	19	7	6	4
ASIC2	0	4	7	13	6	6	4

Estos resultados son coincidentes con los existentes en la literatura en modelos murinos, y es la primera vez que se establecen en humanos.

Conclusiones. 1.- Los husos neuromusculares de los músculos interóseos y lumbricales de la mano humana están inervados por fibras nerviosas con inmunorreacción positiva para la parvalbumina (específica de los

propioceptores) y la sinaptofisina. 2.- Las fibras nerviosas intrafusales de los husos neuromusculares de los músculos interóseos y lumbricales de la mano humana expresan las mecanoproteínas PIEZO2 y ASIC2. 3.- El patrón de expresión de PIEZO1 en los husos neuromusculares de los músculos interóseos y lumbricales de la mano humana no es compatible con inervación propioceptora de las fibras intrafusales. 4.- En base a la distribución de los tamaños de los somas neuronales, los ganglios raquídeos cervicales contienen un 18% de propioceptores, que son todos parvalbumina positivos. 5.- Los propioceptores de los ganglios raquídeos cervicales humanos expresan las mecanoproteínas PIEZO1, PIEZO2 y ASIC2.

SUMMARY

Proprioception is the sense of position and movement. It is mediated by proprioceptors, a small subset of mechanosensory neurons located in the spinal ganglia that transmit information about the stretching and tension of muscles, tendons, and joints. These neurons supply afferent innervation to specialized sensory organs in muscles (muscle spindles) and tendons (Golgi tendon organs). Once mechanotransduction is performed, the information originating from the proprioceptors travels through two main nerve pathways that reach the central nervous system at the level of the spinal cord and the cerebellum (unconscious) and cerebral cortex (conscious) for processing. On the other hand, since the stimuli for proprioceptors are mechanical (stretching, tension), proprioception can be considered as a modality of mechanosensitivity and the supposed mechanotransducers must be mechanosensitive ion channels. To date, acid-sensitive ion channel 2 (ASIC2), vanilloid transient potential receptor receptor ion channel 4 (TRPV4), and PIEZO2 have been proposed as candidates in experimental models.

Hypothesis and objectives. Hypothesis: Human skeletal muscles, as in the rest of mammals, express ion channels of the ASIC and Piezo families at the level of proprioceptors, their sensory nervous system intramuscularly, especially in the neuromuscular spindles, and intratendinous, in the tendon organs of the Golgi. **Objectives:** The **general objective** of the study is to contribute to the knowledge of the basis of proprioception of the human musculoskeletal system. The **specific objectives** are as follows: 1.- To study the neuromuscular spindles and tendon organs in human skeletal muscles that are particularly rich in these formations: the lumbrical and interosseous muscles of the hand; 2.- To determine the expression patterns of the mechanoproteins PIEZO1, PIEZO2 and ASIC2 in neuromuscular spindles and Golgi tendon organs; To see if some of the mechanoproteins investigated are co-expressed in muscle proprioception receptors.

Material and techniques. Human material from fixed cadavers and cryopreserved cadaveric pieces, not fixed, obtained in the Department of Human Anatomy and Embryology of the University of Oviedo, was used. The cadavers corresponded to 7 men and 5 women, aged between 61 and 83 years. From all of them, 3 lumbrical muscles, 2 dorsal interosseous muscles and 2 palmar interosseous muscles were obtained (n = 84). The fresh, cryopreserved material was washed in a cold saline solution, divided into segments and fixed for 48 h in buffered 10% formaldehyde and then routinely processed for paraffin inclusion. In the study, human cervical spinal ganglia (n = 8) from the Biobank of the accredited research group SINPOS (National Registry of Biobanks, Collections Section, Ref. C-0001627) were included. The study was approved by the Biomedical Research Ethics Committee of the Principality of Asturias, Spain (Cod. CEIm, Past: Project 266/18). All material was obtained in accordance with Spanish legislation (RD 1301/2006; Law 14/2007; DR. 1716/2011; Order ECC 1414/2013) and the guidelines of the Helsinki Declaration II.

Structural techniques, immunohistochemistry by the PAP method and immunofluorescence coupled to confocal laser microscopy were performed using the antibodies in the following table:

Antigen	Raised in	Dilution	Purchased from
PIEZO1	Rabbit	1:200	Alomone ¹
PIEZO2	Rabbit	1:200	Sigma-Aldrich ²
ASIC2	Rabbit	1:200	Lifespan Biosciences ³
NSE (clone BBS/NC/VI-H14)	Mouse	1:500	Dako ⁴
NFP (clone 2F11)	Mouse	1:200	Roche ⁵
Sinaptofisina (clone 27G12)	Mouse	Prediluido	Leica Biosystems ⁶
S100 P	Mouse	1:500	Dako ⁴
PaV (clone C12)	Mouse	1:200	ThermoFisher ⁷

1Jerusalem, Israel; 2Saint Louis, MS, USA; 3Seattle, WA, USA; 4Glostrup, Denmark; 5Viena, Austria; 6Madrid, Spain; 7

ASIC2: made against a specific synthetic, human peptide.

PIEZO1: Polyclonal antibody developed against a synthetic peptide (C)EDLKPQHRRHISIR, corresponding to amino acids 1863-1876 of rat PIEZO1.

PIEZO2: Polyclonal antibody developed against a synthetic human PIEZO2 peptide with the sequence: VFGFWAFGKHSAAADITSSLSAQVPGPFLVMVLIQFGT MVVD RALYLK

Quantitative image analysis was performed on spinal ganglia preparations using an automatic image analysis system (Quantimet 550, Leica, QWIN Program). The percentage and size (mean diameter in μm) of immunoreactive neurons were evaluated, evaluating five randomly selected fields per section (2.5 mm^2). For the evaluation of cell body size, only neuronal profiles with apparent nuclei were considered, and neurons were divided into 7 size classes, measured in steps of $10 \mu\text{m}$ in diameter.

Results and discussion. The muscle spindles located in the lumbrical and interosseous muscles of the human hand are made up of a variable number of intrafusal fibers. The nervous system that supplies them (annulo-spiral endings and flowering endings) express an immunoreaction to parvalbumin and synaptophysin without any age-related differences between the different muscles. Of the mechanoproteins analyzed, PIEZO2 and ASIC2 are detected in intrafusal nerve fibers, while PIEZO1 is present in intrafusal nerve fibers that do not form typical endings. The images do not suggest the presence of mechanoproteins in the motor plates of the spindles.

Regarding the proprioceptors of the cervical spinal ganglia, the distribution of neurons in the pre-established age ranges suggests that they represent around 18%; This primary sensory neuron subpopulation was parvalbumin (+). In all of them, immunoreaction was detected for the mechanoproteins studied (Table).

	<10 μm	11-20 μm	21-30 μm	31-40 μm	41-50 μm	51-60 μm	>60 μm
Distribución	6	31	26	19	8	6	4
PaV	0	0	3	11	6	6	4
PIEZO1	4	27	25	17	7	6	3
PIEZO2	1	13	25	19	7	6	4
ASIC2	0	4	7	13	6	6	4

These results are consistent with those in the literature in murine models, and this is the first time they have been established in humans.

Concluding remarks. 1. The muscle spindles of the interosseous and lumbrical muscles of the human hand are innervated by nerve fibers with positive immunoreaction to parvalbumin (specific to proprioceptors) and synaptophysin. 2. The intrafusal nerve fibers of the muscle spindles of the interosseous and lumbrical muscles of the human hand express the mechanoproteins PIEZO2 and ASIC2. The expression pattern of PIEZO1 in the muscle spindles of the interosseous and lumbrical muscles of the human hand is not compatible with proprioceptive innervation of the intrafusal fibers. Based on the size distribution of neuronal somas, the cervical spinal ganglia contain 18% proprioceptors, which are all parvalbumin positive. Human cervical spinal ganglia proprioceptors express the mechanoproteins PIEZO1, PIEZO2 and ASIC2.

Dedicatória

Agradecimientos

Índice

Documentos administrativos, 5

Resumen, 9

Dedicatoria, 13

Agradecimientos,15

1. Introducción, 19

2. Estado actual del problema, 25

3. Hipótesis y Objetivos, 43

4. Material y Técnicas, 47

5. Resultados, 53

6. Discusión, 63

7. Conclusiones,71

8. Bibliografía, 75

Anexo 1 – Curriculum vitae, 91

Anexo 2 – Artículo derivado de la Tesis Doctoral, 93

1. Introducción

1. Introducción

La propiocepción es una cualidad de la somatosensibilidad y se puede definir como la información inconsciente que llega al sistema nervio central sobre el estiramiento y la tensión de músculos, tendones, articulaciones y piel, para informarlo sobre la estática y la dinámica de los músculos y las articulaciones. Este tipo de sensibilidad ha sido muy estudiado en los músculos dependientes de los nervios espinales y en la actualidad se conocen con bastante precisión las estructuras nerviosas implicadas en ella (Dijkerman y de Haan, 2007; Butler et al., 2016; Blecher et al., 2018). Por el contrario, las bases moleculares de la propiocepción de los músculos esqueléticos humanos son muy poco conocida (Nagel y Chesler, 2022).

La sensibilidad mecánica, y la propiocepción no deja de ser una parte de esta, requiere que las fuerzas actúen sobre un sensor. Consecuentemente, las vías nerviosas que conducen propiocepción al sistema nervioso central se inician en órganos sensitivos especializados (especialmente los husos neuromusculares y los órganos tendinosos) suplidos por los axones de neuronas mecanosensibles especializadas localizadas en los ganglios sensitivos raquídeos y de los pares craneales (Proske y Gandevia, 2012; Bewick y Banks, 2015; Proske, 2015) denominadas **propioceptores**. La información codificada por esos órganos sensitivos y los propioceptores da origen a sensaciones inconscientes, y también conscientes, necesarias para la mayoría de las funciones motoras básicas (Akay et al., 2014).

La propiocepción es un sentido que incluye la posición y el movimiento de las partes del cuerpo entre sí, y la fuerza y el esfuerzo asociados con la contracción y el movimiento muscular. Pero propiamente el término **propiocepción** se aplica a la información sensorial que contribuye al sentido de la posición del yo, mientras que la **cinestesia** se refiere al sentido del movimiento. La primera es considerada como una función automática e inconsciente en contraste con la segunda considerada como consciente. En palabras de Kröger y Watkins (2021) "*La información propioceptiva nos informa sobre el estado contráctil y el movimiento de los músculos, sobre la fuerza muscular, la pesadez, la rigidez, la viscosidad y el esfuerzo y, por lo tanto, es necesaria para cualquier movimiento coordinado, marcha normal y el mantenimiento de una postura estable*".

Como se acaba de comentar, la información propioceptiva llega al sistema nervioso central, pero a diferencia de otros componentes de la somatosensibilidad, gran parte del sentido propioceptivo no llega a hacerse consciente. Esto se debe, probablemente, a la supresión por señales motoras (Williams y Chapman, 2000) o a inhibiciones a lo largo de las vías somatosensoriales (Ciancia et al., 1980). El conocimiento preciso de las vías de la propiocepción, especialmente las de la propiocepción consciente, es de capital interés para comprender mejor este sentido y en la actualidad las técnicas de neuroimagen están proporcionando nuevos conocimientos sobre el proceso cerebral de la propiocepción.

Aunque las bases estructurales de la propiocepción son bastante bien conocidas el fundamento molecular de la misma comienza a ser conocido ahora, aunque se cree que es necesaria una variedad de canales iónicos, de vesículas similares a las sinápticas e interacciones de los propioceptores con las fibras intrafusales de los husos neuromusculares (Bewick y Banks, 2014; Wilson, 2022; Marasco y de Nooij, 2023) (Figura 1.1).

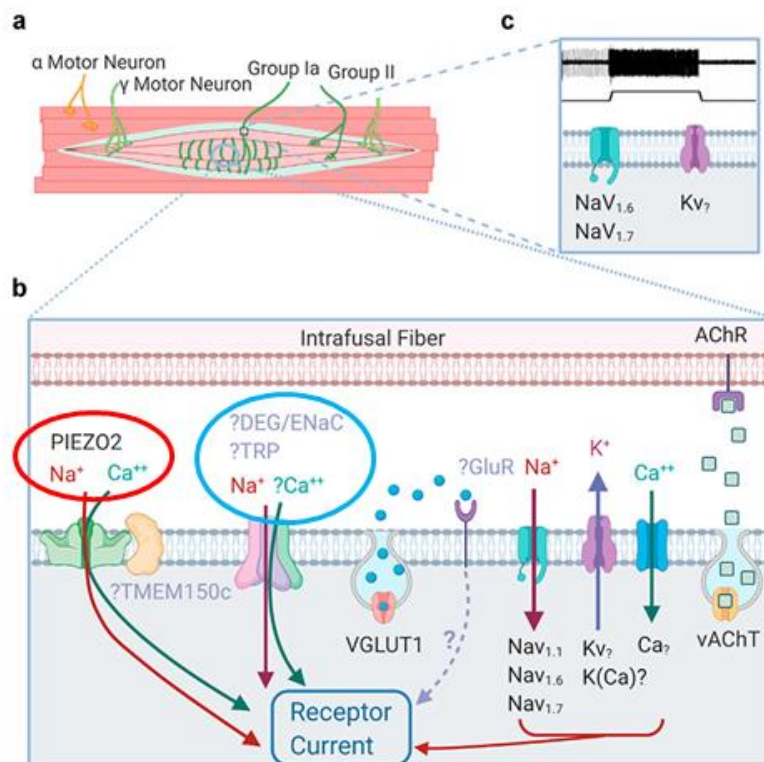


Figura 1.1.- Moléculas presumiblemente implicadas en la mecanosensación-mecanotransducción en las aferencias de los husos neuromusculares. a) Esquema de la inervación de los husos neuromusculares; b) Canales iónicos detectados en las terminaciones aferentes de los husos neuromusculares entre los que se encuentran PIEZO2 y la familia Deg/ENa⁺C (que incluye los canales ASIC). Tomado de Wilson (2022).

En el año 2010 se produjo un enorme avance en el campo de la mecanobiología con descubrimiento de una familia de canales iónicos capaces de activarse por estímulos mecánicos; se los denominó canales piezoeléctricos o canales Piezo y hasta la fecha se han identificado dos miembros: PIEZO1 y PIEZO2. La importancia de estos canales de Ca^{2+} en la propiocepción se puso en evidencia al demostrarse que en ratones deficientes en ellos y las mutaciones del gen que lo codifica en humanos tienen profundos déficits mecanosensoriales que incluyen una pérdida del sentido de la propiocepción (ver para una revisión Kröger, 2018; Nagel y Chesler, 2022). En el sistema musculoesquelético los canales iónicos Piezo desempeñan funciones bien caracterizadas. PIEZO1 funciona para mantener la masa muscular y ósea, detectar el estiramiento de los tendones y regular la senescencia y la apoptosis en respuesta a estímulos mecánicos dentro del cartílago y el disco intervertebral. PIEZO2, por su lado, es esencial para la transducción de la propiocepción en el sistema nervioso (Savadipour et al., 2023).

Además de los miembros de la familia de canales Piezo, existen evidencias de que algunos miembros de la familia de canales iónicos ASIC (*acid sensing ion channels*), especialmente ASIC2, pueden tener también un papel importante en la mecanotransducción en los propioceptores (Chen et al., 2018; Oliver et al., 2021; Wu et al., 2021).

Hasta donde nosotros conocemos no existen estudios en humanos sobre la localización de proteínas de canales iónicos mecanosensibles en las terminaciones periféricas de los propioceptores en los husos neuromusculares. Ni tampoco se ha estudiado la posible co-localización en los mismos terminales de más de un canal iónico mecanosensible.

El grupo de investigación acreditado SINPOS (Sistema Nervioso Periférico y Órganos de los Sentidos) de la Universidad de Oviedo trabaja desde hace más de tres décadas sobre las bases estructurales, celulares y moleculares de la somatosensibilidad. El presente trabajo de Tesis Doctoral se enmarca en este contexto y se ha realizado utilizando material humano y técnicas morfológicas y de inmunohistoquímica.

2. Estado del problema

2. Estado actual del problema

La propiocepción se origina por la activación periférica de los **propioceptores**, un subconjunto de neuronas mecanosensitivas que proporcionan inervación aferente a órganos sensoriales especializados ubicados dentro de los músculos y tendones, pero probablemente también en las cápsulas y ligamentos articulares, y en la piel.

Según Proske y Gandevia (2009, 2012), el sentido de *"propiocepción se logra a través de una suma de información sensorial periférica que describe el grado y los cambios en la longitud y la tensión muscular, el ángulo de la articulación y el estiramiento de la piel"*. De hecho, la definición original de propiocepción acuñada por Sherrington en 1906 (*"En la receptividad muscular vemos que el propio cuerpo actúa como un estímulo para sus propios receptores, los propioceptores"*) sugiere que el cuerpo contiene diferentes tipos de propioceptores. En el presente trabajo nos hemos centrado en los husos neuromusculares y, cuando fue posible localizarlos, los órganos tendinosos de Golgi.

Este capítulo tiene por objeto realizar una revisión de los diferentes aspectos de la propiocepción, pero se centra en la detección en los órganos periféricos de la propiocepción y en las neuronas que los suplen de mecanoproteínas potencialmente implicadas en el proceso de la mecanotransducción propioceptiva. Para los interesados en profundizar sobre otros aspectos de la propiocepción existen excelentes revisiones críticas sobre el tema (Proske y Gandevia, 2009, 2012, 2018; Kröger, 2018; Proske, 2019; Kröger y Watkins), incluidos los propioceptores periféricos (Banks, 2015).

2.1. Propioceptores

Las neuronas propioceptivas representan una pequeña población (alrededor del 7-10%) de las neuronas sensitivas primarias de los ganglios raquídeos y se corresponden con las que poseen los cuerpos celulares más grandes y forman las fibras sensitivas de mayor calibre, la vaina de mielina más espesa y las que tienen mayor velocidad de conducción (Marmigère y Ernfors, 2007). Se han clasificado y diferenciado de otras neuronas de los ganglios raquídeos, e identificado como una población neuronal única, utilizando el análisis del transcriptoma de una sola célula (Oliver et al., 2020). Por lo general, expresan el receptor TrkC (considerado el específico para la neurotrofina-3 de la familia de factores de crecimiento de las neurotrofinas) y la proteína ligante de Ca²⁺ parvalbúmina (Arber et

al., 2000; Hippenmeyer et al., 2005), así como otros marcadores menos específicos (Poliak et al. 2016).

La prolongación periférica de los axones de las neuronas pseudounipolares propioceptivas forma fibras A α y A β de gran calibre y mielinizadas mientras que la prolongación central establece sinapsis en la médula espinal o asciende a través de las columnas dorsales de la médula espinal para llegar a los núcleos grácil y cuneado de la parte baja del bulbo raquídeo.

Desde un punto de vista funcional, los propioceptores son mecanorreceptores de bajo umbral y adaptación lenta (ver Zimmerman et al., 2014; Cobo et al., 2020) que inervan los husos neuromusculares y los órganos tendinosos de Golgi (Proske y Gandevia, 2012; Proske, 1015).

2.2. Órganos periféricos de la propiocepción

Los receptores periféricos de la propiocepción se encuentran en los tejidos alrededor de las articulaciones, incluida la piel, los músculos, los tendones, las fascias, las cápsulas articulares y los ligamentos (Grigg, 1994) que contienen diferentes morfotipos de formaciones nerviosas sensitivas o corpúsculos sensitivos suplidos por axones de mecanorreceptores y propioceptores (Banks et al., 2009). Actualmente se piensa que la propiocepción no es generada por un solo receptor, sino por múltiples receptores. En cualquier caso, la propiocepción se ha relacionado con receptores sensoriales localizados en los músculos, mientras que la cinestesia se ha asociado más con receptores articulares y cutáneos (Burke et al., 1988; Collins y Prochazka, 1996; Frith, 2005). Sin embargo, los considerados históricamente como verdaderos órganos de la propiocepción son los **husos musculares** y los **órganos tendinosos** de Golgi.

Las formaciones nerviosas sensitivas de las articulaciones son corpúsculos de Ruffini y Pacini que señalan el movimiento de las articulaciones, pero no la dirección del movimiento o la posición de la articulación (Grigg, 1994). En cuanto a los receptores cutáneos, en la piel glabra hay cuatro morfotipos de formaciones nerviosas sensitivas (corpúsculos de Meissner, Pacini y Ruffini, y complejos célula de Merkel-neurita) (Johansson et al., 2009; Zimmerman et al., 2014; Cobo et al., 2021) que se estimulan por factores mecánicos. Hasta el momento no se ha podido establecer definitivamente el

papel de los corpúsculos sensitivos cutáneos como propioceptores (Gandevia et al., 1986; Edin, 2004; Izumizaki et al., 2010), aunque es posible una convergencia entre las aferencias cutáneas y musculares a nivel medular y talámico.

Pero independientemente de la modesta contribución de los mecanorreceptores cutáneos y articulares a la propiocepción, los principales receptores sensibles al estiramiento son los husos musculares que se encuentran en la mayoría, pero no en todos, los músculos esqueléticos. Por ejemplo, están ausentes de la mayoría de los músculos cefálicos (Cobo et al., 2017, 2019). Por el contrario, son muy abundantes en los músculos que deben ejecutar movimientos de gran precisión (Morrison y Hill, 2011).

Por otro lado, los principales receptores sensibles a la tensión son los órganos tendinosos de Golgi, ubicados en los extremos de las fibras musculares (Jami, 1992; Proske, 1993).

Estos dos órganos sensoriales, husos neuromusculares y órganos tendinosos, responden a cambios en las condiciones mecánicas, es decir, en la longitud del músculo (husos musculares) o en la fuerza generada activamente (órganos del tendón de Golgi), pero ambos son receptores de contracción.

En los párrafos que siguen se realizará una descripción somera de los husos neuromusculares y órganos tendinosos, solo para permitir comprender los resultados del presente estudio. Para los interesados en conocer en detalles la estructura y función de los husos neuromusculares y los órganos tendinosos de Golgi, remitimos a los trabajos de Vega (1999), Kistemaker et al. (2013), Banks (2015), Ellaway et al. (2015), Proske (2015) y Macefield y Knellwolf (2018).

2.2.1. Husos neuromusculares

Los husos neuromusculares de los vertebrados son órganos sensoriales complejos, dispuestos en paralelo con las fibras musculares de los músculos que los alojan y que poseen inervación sensitiva y motora. Cada huso muscular recibe al menos una fibra sensitiva que inerva fibras musculares especializadas denominadas fibras intrafusales, las cuales también reciben inervación motora por γ -motoneuronas (Banks, 2005, 2015). Estructuralmente, son mecanorreceptores encapsulados, y funcionalmente son mecanorreceptores de bajo umbral y adaptación lenta (Proske y Gandevia, 2012).

Los husos neuromusculares son muy variables en número, desde ninguno en la mayoría de los músculos cefálicos (ver Cobo et al., 2019) hasta numerosos en los músculos lumbricales o profundos del cuello (Soukup et al., 2003; Kulkarni et al., 2001; Morrison y Hill, 2011). Estas diferencias se atribuyen a las demandas funcionales de los músculos, pero el número de husos musculares por unidad motora es bastante similar (Liu et al., 2002) y no se han apreciado diferencias topográficas en los husos neuromusculares musculares entre los músculos monoarticulares y poliarticulares (Liu et al., 2005).

Dentro de la cápsula conectiva que delimita cada huso muscular se encuentran las fibras intrafusales (fibras musculares estriadas) y un espacio periaxial que contiene componentes de la matriz extracelular y líquido.

Desde un punto de vista topográfico, en el huso muscular se pueden diferenciar tres zonas: la zona central o ecuatorial, la zona yuxta-ecuatorial y la zona terminal o polar; pequeños segmentos de las fibras intrafusales se pueden encontrar fuera de los polos del músculo (Fig. 1).

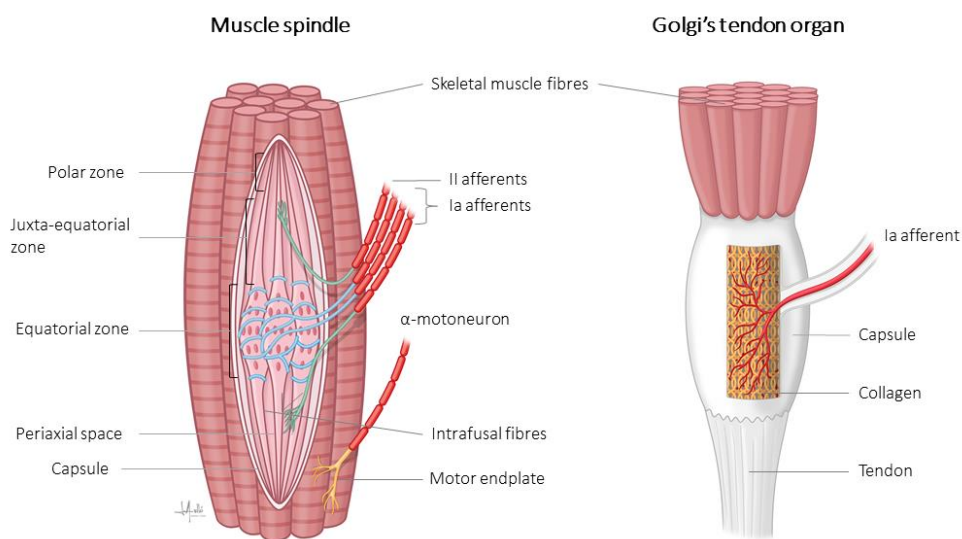


Figura 2.1.- Representación esquemática de un huso neuromuscular y un órgano tendinoso de Golgi. Los husos neuromusculares son receptores sensitivos encapsulados formados por fibras musculares intrafusales (en saco nuclear tipos 1 y 2 y en cadena nuclear), un espacio periaxial lleno de líquido y una cápsula conectiva. Son inervados por aferentes Ia (azul) y II (verde) y por γ -motoneuronas. Los órganos tendinosos de Golgi son formaciones sensitivas encapsulados formadas por haces de fibras de colágeno y aferentes de tipo Ia (rojo). Tomado de Vega y Cobo (2021).

2.2.1.1. Las fibras musculares intrafusales

Banks et al. (1977) establecieron que los husos neuromusculares de los mamíferos contienen tres tipos de fibras musculares intrafusales que según su morfología y la disposición de los núcleos en la zona ecuatorial, se dividen en dos categorías principales: fibras en saco nuclear y fibras de cadena nuclear. Ambos tipos difieren en estructura, perfil histoquímico (tipo de miosina, actividad de ATPasa; Ovalle y Smith, 1972; Kucera y Dorovini-Zis, 1979; Liu et al., 2003) y propiedades funcionales. Las fibras en saco nuclear son mayores en diámetro y longitud que las fibras en cadena nuclear, se extienden fuera de la cápsula y se pueden subdividir en los tipos de saco nuclear 1 (bag1) y saco nuclear 2 (bag2; ver para una revisión Thornell et al., 2015). Los músculos humanos contienen de 8 a 20 fibras intrafusales y puede carecer de fibras bag1 o bag2 (Liu et al., 2003).

2.2.1.2. Inervación sensitiva

"Así como el número de terminaciones sensoriales varía de un huso a otro, incluso dentro de un solo músculo, también lo hace el número de axones motores que suplen los husos" (Banks, 2015). Hay dos tipos de aferencias que inervan las fibras intrafusales: las terminaciones primarias (tipo Ia) y secundarias (tipo II) que difieren en su velocidad de conducción (Banks, 2015).

Cada huso muscular recibe solo una fibra **aferente Ia** que rodea como un muelle la zona ecuatorial de todas las fibras intrafusales (**terminaciones espirales** o **terminaciones anularespirales**) (**Figura 2.2**). Cuando las terminaciones en espiral se deforman, detectan cambios en la longitud del músculo. Las aferencias primarias son sensibles al estiramiento dinámico, tienen una descarga irregular espontánea o mantenida volitivamente, y exhiben una respuesta negativa en el punto de relajación (es decir, estiramiento muscular) seguida de una contracción isométrica lenta en rampa; se apagan durante la contracción voluntaria rápida (Banks, 2015).

El número de terminaciones **aferentes de tipo II** en un huso muscular varía de cero a cinco, y suministran una fibras colaterales que inervan las fibras en cadena nuclear. Las terminaciones de las aferencias secundarias son espirales que terminan en los extremos polares de las fibras intrafusales (**Figura 2.2**). Las aferencias secundarias tienen una

descarga tónica regular y no muestran una respuesta negativa al final de una contracción voluntaria de rampa y retención (Edin y Vallbo, 1990; Proske, 1997).

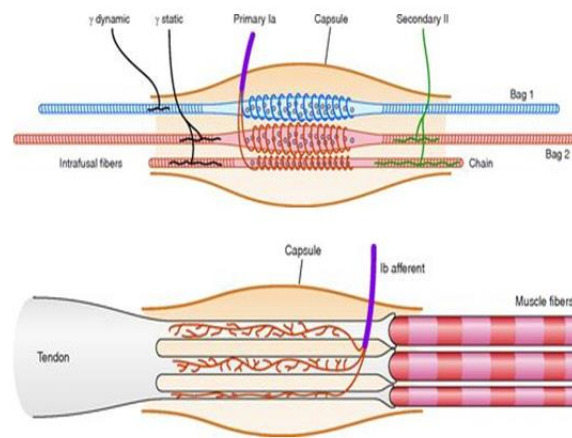


Figura 2.2.- Esquema de la inervación de los husos neuromusculares (superior; tomada de Proske, 1997) y de los órganos tendinosos de Golgi (inferior; tomada de Proske et al., 1993).

2.2.1.3. Inervación motora

Las fibras musculares intrafusales también están inervadas por motoneuronas eferentes (inervación fusimotora). Los axones de las motoneuronas entran en el huso neuromuscular junto con las fibras sensitivas e inervan las fibras intrafusales en las regiones polares formando placas terminales motoras.

La inervación motora se origina a partir de γ -motoneuronas mielinizadas (diámetro de 4 a 8 μm), también conocidas como **motoneuronas fusimotoras**, que se han diferenciado en estáticas y dinámicas. Los axones dinámicos tienen un efecto débil en el disparo aferente primario, mientras que los estáticos tienen una gran influencia en las aferencias primarias y secundarias (ver Proske, 1997).

Ocasionalmente, puede existir inervación eferente adicional de los husos neuromusculares que se origina en axones destinados a las fibras musculares extrafusales, conocidos como **β -motoneuronas** o fibras esquelético-fusimotoras, los cuales terminan en los extremos polares de las fibras intrafusales mediante placas motrices. Las placas terminales de las γ -motoneuronas difieren estructuralmente de las formadas por las α -motoneuronas en las musculares esqueléticas, pero ambas son sinapsis colinérgicas con muchas características en común, incluidos los pliegues de unión

y una lámina basal que llena la hendidura sináptica (Edin y Vallbo, 1990; Banks, 1994; Proske, 1997; Manuel y Zytnicki, 2011; Bewick y Banks, 2015).

La estimulación de las γ -motoneuronas da lugar a la excitación de las aferencias Ia y II del huso neuromuscular. Por otro lado, la estimulación de las α -motoneuronas que inervan las fibras musculares extrafusales, origina la coactivación de las γ -motoneuronas, lo que a su vez provoca la contracción de los extremos polares de las fibras intrafusales, restaurando la tensión y la sensibilidad del huso muscular para estirarse. Por lo tanto, la función γ -motoneurona controla la sensibilidad de las aferencias del huso muscular como detectores de longitud por lo que la función del huso neuromuscular como sensor de longitud surge depende de su relación con el músculo en el que se encuentra. Cualquier cambio de longitud en el músculo da como resultado un estiramiento de las fibras intrafusales que es detectado por los receptores sensoriales ubicados en las regiones ecuatoriales y polares del huso muscular (Bewick y Banks, 2015).

Como se comentó previamente, los husos neuromusculares son detectores de estiramiento (Matthews, 2015). Pero además, una serie de estudios recientes *in vivo* implican a los husos neuromusculares en el mantenimiento de la alineación de la columna vertebral o en la realineación de los huesos fracturados. Estos descubrimientos se han hecho en varias líneas de ratón carentes en parte o completamente de mecanosensores funcionales (Blecher et al., 2018). También participan en la regeneración de los axones de la médula espinal después de una lesión (ver Kröger, 2018).

2.2.2. Órgano tendinoso de Golgi (huso tendinoso)

El órgano tendinoso de Golgi o huso tendinoso se localiza en los orígenes e inserción de los tendones, o raramente dentro del tendón. Es una formación nerviosa sensitiva que informa sobre la tensión muscular a través de un aferente Ib (**Figuras 2.1 y 2.2**).

Estructuralmente consiste en una cápsula y dentro de ella fibras de colágeno y fibras musculares (3-50). Entre estos elementos hay un único axón aferente Ia que se ramifica para inervar las partes distal y proximal del órgano (Jami, 1992; Proske, 1981). Con respecto a las fibras del músculo esquelético, el órgano tendinoso de Golgi se encuentra en serie entre el músculo y el tendón.

El modelo del tendón de Golgi reacciona a "las respuestas estáticas y dinámicas a la activación de unidades motoras individuales cuyas fibras musculares se insertan en el órgano del tendón de Golgi, la adaptación propia y cruzada, la suma no lineal cuando múltiples unidades motoras están activas en el músculo y la relación proporcional entre la adaptación cruzada y la suma registrada para varios pares de unidades motoras" (Proske, 1981; Mileusnic y Loeb, 2006).

2.3. Bases moleculares de la propiocepción

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

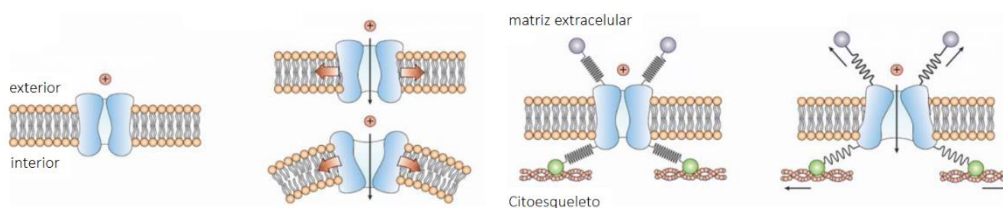


Figura 2.3.- Tipos básicos de canales mecanosensitivos. Modificado de Ridone et al. (2019).

Con carácter general, puede afirmarse que hay dos tipos básicos de canales mecanosensitivos: los que se abren-cierran por la tensión-deformación de las proteínas de la membrana celular (Moe y Blount, 2005; Martinac et al., 2014) y los que abren-cierran por la tensión de las proteínas estructurales unidas a ellos (es decir, de la matriz

extracelular y del citoesqueleto; Meng y Sachs, 2011; Suchyna y Sachs, 2007, 211; Suchyna et al., 2009; Huang et al., 2013; Martinac, 2014) (**Figura 2.3**).

La transducción de la tensión mecánica de músculos y articulaciones en señales eléctricas está mediada por canales iónicos de Na⁺ y, en menor medida, de Ca²⁺ (Hunt et al., 1978). Aunque ya se han identificado varios canales con funciones mecanosensitivas (ver Del Valle et al., 2012), hasta la fecha, en los husos neuromusculares, se han identificado proteínas de la familia Degenerina-ENa⁺C (*degenerin-epitelial sodium channels*) en las vesículas sinaptofisina-positivas de los terminales aferentes, aunque no existen pruebas concluyentes de su participación en la propiocepción (Simon et al., 2010).

También se ha postulado la participación en la propiocepción de los canales iónicos de la familia ASIC (*acid-sensing ion channels*) que se expresan en los aferentes musculares y detectan acidosis extracelular y otros metabolitos liberados durante la isquemia y el ejercicio (Simon et al., 2010). En este sentido, el estudio llevado a cabo por Gautam y Benson (2013) demostró que los heterodímeros de canales ASIC1a, ASIC2a y ASIC3 son los principales canales en las aferencias del músculo esquelético, pero no se pudo demostrar su intervención en la propiocepción.

Pero los canales iónicos mejores candidatos para a mecanotransducción son los de la familia que se han detectado tanto en propioceptores como en los terminales aferentes de los husos neuromusculares (Woo et al, 2015). Estos autores demostraron en dos cepas de ratones *knockout* para Piezo2 la ausencia propioceptores así como mostraron un profundo deterioro de la coordinación en las extremidades y alteraciones en el funcionamiento de los husos neuromusculares.

2.3.1. Mecanotransducción en husos musculares

Los terminales sensitivos de los husos musculares parecen adherirse a la superficie de las fibras musculares intrafusales, y aunque poseen una lámina basal en estrecho contacto con el plasmalema, está ausente en los terminales sensoriales.

2.3.1.1. ¿Neurotransmisión glutamato-érgica aferente en husos musculares?

Bewick y Banks (2015) han demostrado presencia de un sistema completo de neurotransmisión glutamatérgica en las aferencias de los husos neuromusculares

asociado a las vesículas sinápticas típicas de dichos terminales. El glutamato exógeno mejora la excitabilidad del huso, un efecto que puede bloquearse farmacológicamente con moléculas específicas. Por otro lado, las vesículas sinápticas contienen glutamato, que se libera durante el ciclo de la membrana y, posteriormente, es necesario un mecanismo de reposición. Esta observación, sin embargo, no excluye la posibilidad de que otras sustancias neuroactivas también se encuentren en estas terminaciones sensoriales ni que existan otros posibles neurotransmisores aferentes, ya que, lo mismo que ocurre en otros tipos de formaciones nerviosas sensitivas (ver Suazo et al., 2022) este mecanismo transmisor, por si solo, no explica la mecanotransducción.

2.3.1.2. Canales iónicos y mecanoreducción en husos musculares

Además de la posible neurotransmisión clásica, el mecanismo principal de transducción mecánica en las terminaciones sensoriales del huso neuromuscular es la activación de canales iónicos sensibles al estiramiento. La mecanotransducción, es decir, la conversión de estímulos mecánicos en señales biológicas o eléctricas se desencadena por miembros de las superfamilias de canales iónicos de la familia Deg-ENa⁺C (que incluye los canales ASIC), canales de potencial de receptor transitorio (TRP), canales de dominio de dos poros de potasio (K2p) y PIEZO (Delmas y Coste, 2013; Cobo et al., 2020). Algunos de ellos se han detectado directamente en los husos neuromusculares así como en propioceptores que los inervan. Sin embargo, y de manera similar a los mecanorreceptores cutáneos, los canales sensibles al estiramiento responsables de la transducción de estímulos mecánicos en las aferencias del huso neuromuscular no han sido identificados definitivamente (ver Anderson et al., 2017).

3.2.1.2.1. Superfamilia de canales iónicos Deg/ENa⁺C

Cada vez hay más pruebas de la participación de los miembros de la superfamilia Deg/ENa⁺C como canal(es) mecanosensorial(es) en las neuronas aferentes primarias de los mamíferos y en las terminaciones sensoriales de los husos musculares (Ismailov et al., 1997; Althaus et al., 2007; Simon et al., 2010). Las cuatro subunidades del canal ENaC (α , β , γ y δ) están presentes en los terminales sensitivos primarios de los husos neuromusculares (Althaus et al., 2007; Bewick y Banks, 2015).

3.2.1.2.2. Familia de canales iónicos ASIC

Son una familia de canales catiónicos insensibles al voltaje que se expresan en el sistema nervioso y en muchos tipos de células no nerviosas. En roedores y humanos se han identificado seis subtipos de ASIC (ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 y ASIC4) y sus patrones de expresión son ahora bastante conocidos (Baron y Lingueglia, 2015; Lin et al., 2015; Chen y Chen, 2018). Los ASIC pueden ser activados por protones, ácido araquidónico, lisofosfatidilcolina, dióxido de carbono, lactato y estímulos mecánicos (Cheng et al., 2018).

Los ASIC se expresan en el sistema nervioso periférico, neuronas sensitivas del ganglio del trigémino (Ichikawa y Sugimoto, 2002), el núcleo mesencefálico del trigémino (Nakamura y Jang, 2014), el ganglio espiral (Peng et al., 2004), el ganglio nodoso (Lu et al., 2009) y ganglios raquídeos (Cabo et al., 2015; Wu et al., 2021; Papalampropoulou-Tsiridou et al., 2022). Estas aferencias sensoriales inervan tejidos de todo el cuerpo (ver Lin et al., 2023). En particular, ASIC2 se ha detectado en los mecanorreceptores cutáneos (García-Añoveros et al., 2001; Cabo et al., 2015) y los ratones knockout para ASIC2 tienen sensibilidad reducida (Price et al., 2000). Además, también interviene en la barorrecepción (Gannon et al., 2015), en la mecanobiología del tubo gastrointestinal (Page et al., 2005), del sistema urinario (Kobayashi et al., 2009), sistemas auditivo y vestibular (Hildebrand et al., 2004). En base a su localización se les ha implicado en diferentes funciones somatosensoriales, como la nocicepción, el sabor agrio, las interocepciones, el prurito (Peng et al., 2015) y la sngception (una función somatosensorial de la detección de ácidos) (Lin et al., 2018; Hung et al., 2023). Además, la evidencia ha demostrado que los ASIC están involucrados en la mecanotransducción (Chen y Wong, 2013; Cheng et al., 2018) incluida la propiocepción.

En cuanto a los husos neuromusculares hay algunas evidencias a favor de un papel de ASIC2 como mecanotransductor primario en los husos neuromusculares (Althaus et al., 2007; Chen y Wong, 2009; Simon et al., 2010; Lee y Chen, 2018).

Las neuronas sensitivas propioceptoras parvalbúmina expresan ASIC1, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b y ASIC3 (Chiu et al., 2014; Lin et al., 2016; Oliver et al., 2021; Wu et al., 2021). En 2010, Simon et al. descubrieron la expresión ASIC y su papel como canal iónico

mecanosensorial en los propioceptores. ASIC2 se co-localizó con sinaptofisina, un marcador específico de las terminaciones aferentes primarias del huso neuromuscular y de los órganos tendinosos de Golgi (Simon et al., 2010; Oliver et al., 2021). Por su lado, Wu et al. (2021) encontraron ASIC2 en todos los subgrupos de fibras aferentes Ia, Ib y II. De acuerdo con este papel funcional los ratones deficientes en ASIC2, y también en ASIC3, muestran déficits en la sensibilidad mecánica (Lin et al., 2015; Omerbasic et al., 2015). Un estudio reciente mostró que los ratones knockout de ASIC2 presentaban una desalineación esquelética y un rendimiento propioceptivo deficiente en las tareas de caminar con el haz y la coordinación de la marcha, mientras que la morfología de la EM y el GTO, las habilidades de locomoción y la distancia a pie en la cinta rodante eran similares a las de los ratones de tipo salvaje (Bornstein et al., 2023).

3.2.1.2.3. Familia de canales iónicos Piezo

Aunque son varios los candidatos a posibles mediadores de la mecanotransducción-propiocepción, el canal Piezo2 es el que ha demostrado que cumple todos los requisitos para ser considerado el responsable casi único del proceso, siendo actualmente considerado el transductor para la sensación táctil y la propiocepción (Coste et al., 2010; Ranade et al., 2014; Woo et al., 2014; Handler y Ginty, 2021; Villarino et al., 2023).

Piezo 1 y Piezo2 forman una familia de canales iónicos identificados hace una década por Coste et al. (2010) a partir de células N2A de neuroblastoma N2A. Los canales Piezo son catiónicos no selectivos, son permeables al Ca^{2+} y se caracterizan por su gran tamaño y compleja estructura (Murthy et al., 2017; Saotome et al., 2017; Zhao et al., 2018).

En humanos están formados por 2521 y 2752 aminoácidos para Piezo1 y Piezo2, respectivamente, y tienen una identidad del 42 % (Honore et al., 2015). Recientemente se han establecido 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 (Coste et al., 2015; Ge et al., 2015; Zhao et al., 2016). En el caso de Piezo2 se trata de una proteína de con 17-19 hélices transmembrana que se requiere en los canales catiónicos no selectivos mecanosensibles de las células de los mamíferos, aunque los canales iónicos mecanosensibles pueden abrirse también independientemente de estrés mecánico (Honore et al., 2015; Taberner

et al., 2019; Wang et al., 2019). Funcionalmente, Piezo1 es un sensor más polimodal para las fuerzas mecánicas que detectan un mayor número de estímulos, mientras que Piezo2 está más adaptado para detectar específicamente el tacto mecánico (Bagriantsev y Gracheva, 2014; Wu et al., 2017).

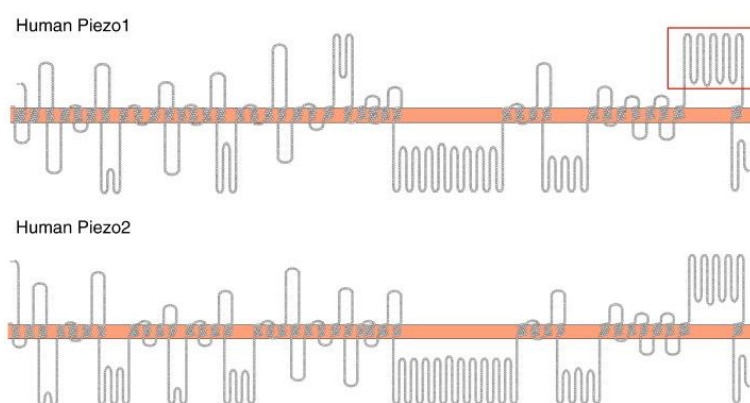


Figura 2.5. - Estructura de los canales mecanosensitivos Piezo1 y Piezo2 humanos. Modificado de Soattin et al. (2016).

En la década transcurrida desde su descubrimiento, se ha demostrado que los canales PIEZOs son canales iónicos activados por la fuerza conservados evolutivamente; sus homólogos y ortólogos se encuentran en plantas, eucariotas unicelulares e invertebrados. En plantas, protistas y gusanos (Coste et al., 2010), insectos (Kim et al., 2012) y múltiples especies de vertebrados, incluidos peces (Faucherre et al., 2013), aves (Schneider et al., 2014), roedores (Ranade et al., 2014) y humanos (Coste et al., 2013; Chesler et al., 2016).

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

Piezo 1 se ha detectado en una gran variedad de tejidos nos nerviosos y también en algunos nerviosos periféricos. Shin et al. (2023) informaron de la presencia de PIEZO1 y

en corpúsculos sensitivos cutáneos de ratas, y Yamanishi e Iwabuchi (2023), de la expresión de PIEZO2 tanto en el axón como en las células gliales terminales de las terminaciones nerviosas lanceoladas humanas. Muy recientemente, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que los corpúsculos de Meissner digitales y del prepucio, así como los corpúsculos de Krause, humanos expresan Piezo1 en el axón, y en los corpúsculos genitales también en las células laminares (Cuendias et al., 2023; García-Mesa et al., 2023, ambos trabajos aceptados).

Piezo2 se encuentra muy distribuido en el sistema nervioso periférico de los vertebrados. En los ganglios raquídeos *PIEZO2* es detectable en todos los tipos conocidos de mecanorreceptores de bajo umbral (LTMR), lo que es coherente con un amplio papel en el tacto (Szcot et al., 2017; Nguyen et al., 2017; Zheng et al., 2019; Sharma et al., 2020; von Buchholtz et al., 2020). Utilizando diferentes métodos se ha detectado en una subpoblación de neuronas en los ganglios raquídeos (Coste et al., 2010; Roh et al., 2020; Shin et al., 2021), células de Merkel, complejos célula de Merkel-axón y corpúsculos de Meissner, además de las terminaciones nerviosas lanceoladas de la piel con pelo (Coste et al., 2010; Ikeda et al., 2014; Li et al., 2014; Maksimovic et al., 2014; Ranade et al., 2014; Woo et al., 2014, 2015; García-Mesa et al., 2017, 2021, 2022; Moayedí et al., 2018; García-Piqueras et al., 2019; Handler et al., 2023; Martín-Cruces et al., 2023; Qi et al., 2023). Pero además, Piezo2 se encuentra ampliamente distribuido en células no nerviosas como condrocitos (Lee et al., 2014), odontoblastos (Khatibi Shahidi et al., 2015), células endoteliales (Ferrari et al., 2015), y células enterocromafines del intestino (Wang et al., 2017).

En los vertebrados, PIEZO2 tiene un papel sensorial especializado. Los estudios knockout en ratones (Ranade et al., 2014; Woo et al., 2015; Murthy et al., 2018; Szcot et al., 2018; Zeng et al., 2018) y el estudio de individuos humanos con mutaciones raras de pérdida de función (Chesler et al., 2016; Szcot et al., 2018) han revelado que PIEZO2 es de hecho un mecanotransductor esencial para el tacto, la propiocepción y la interocepción. De acuerdo con las funciones que se le atribuyen, los animales deficientes en Piezo2 carecen de tacto fino y propiocepción sin que se afecten otras funciones somatosensoriales (Ranade et al., 2014; Woo et al., 2015). Cada vez está más claro que PIEZO2 es también muy importante para la interocepción, así como para la somatosensación general (Umans

y Liberles, 2018; Min et al., 2019; Prescott et al., 2020). PIEZO2 es necesario para la transducción en el dolor mecánico (Murthy et al., 2018), prurito (Feng et al., 2018), respiración (Chesler et al., 2016; Nonomura et al., 2017), digestión en el sentido más amplio del término (Kupari et al., 2019; Hockley et al., 2019), micción (Marshall et al., 2020), barorreflejos (Zeng et al., 2018; Min et al., 2019; Miglis y Muppidi, 2019) y la propiocepción, así como otras menos conocidas (Szczot et al., 2021).

Las mutaciones en el gen que codifica para Piezo2 en humanos se manifiestan clínicamente por una pérdida selectiva de la percepción del tacto y disminución de la propiocepción, así como síndromes complejos que implican articulaciones, músculos oculares y desarrollo óseo (McMillin et al., 2014; Alisch et al., 2016; Chesler et al., 2016; Mahmud et al., 2016; Alper et al., 2017; Haliloglu et al., 2017).

En cuanto a los propioceptores tanto los somas de las neuronas como las proyecciones periféricas a los husos neuromusculares y órganos tendinosos expresan PIEZO2 (Woo et al., 2014, 2015). La pérdida de Piezo2 en las neuronas propioceptivas da lugar a ataxia y dismetría, movimientos corporales severamente descoordinados y posiciones anormales de las extremidades, contractura de múltiples articulaciones y debilidad muscular, lo que sugiere que PIEZO2 requiere la actividad de estos mecanosensores (Coste et al., 2013; Chesler et al., 2016; Delle Vedove et al., 2016; Haliloglu et al., 2017; Mahmud et al., 2017; Assaraf et al., 2020). Recientemente Flórez-Paz et al. (2016) han estudiado la expresión de Piezo2 en las neuronas propioceptivas del núcleo mesencéfalo del trigémino que participan en el procesamiento de información propioceptiva de la cara y la cavidad oral. Las alteraciones en la coordinación de esas zonas tras la eliminación selectiva de Piezo2 demuestran que este canal cumple un papel crítico en las neuronas propioceptoras que inervan los músculos de la cabeza.

Hasta donde nosotros conocemos no se ha estudiado la presencia de ASIC1 en las neuronas propioceptivas ni en sus proyecciones periféricas. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado la presencia de Piezo1 en los axones que suplen los corpúsculos sensitivos en diferentes localizaciones anatómicas.

Sobre la base de los datos clínicos, quizás uno de los fenotipos más profundos observados en ausencia de la función PIEZO2 es la falta total de propiocepción. Los experimentos en

ratones demuestran que estos fenotipos surgen un fallo en las neuronas propioceptivas para ser activadas por fuerzas mecánicas. La delección condicional *de PIEZO2* en los propioceptores de ratón (Woo et al., 2015) o en muchas clases de neuronas sensoriales (Murthy et al., 2018; Szczot et al., 2018) da lugar ataxia grave, marcha irregular y postura atípica, aunque los receptores periféricos de los propioceptores no presentan cambios (Woo et al., 2015).

3. Hipótesis y objetivos

3. Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Los músculos esqueléticos humanos, como en el resto de los mamíferos, expresan canales iónicos de las familias ASIC y Piezo a nivel de los propioceptores, su sistema nervioso sensitivo intramuscular, especialmente en los husos neuromusculares, e intratendinoso, en los órganos tendinosos de Golgi.

Objetivos

El **objetivo general** del estudio es contribuir al conocimiento de las bases de la propiocepción del sistema músculo-esquelético humano.

Los **objetivos específicos** son los siguientes:

- 1.- Estudiar los husos neuromusculares y órganos tendinosos en los músculos esqueléticos humanos que son particularmente ricos en estas formaciones: los músculos lumbricales e interóseos de la mano; y
- 2.- Determinar los patrones de expresión de las mecanoproteínas PIEZO1, PIEZO2 y ASIC en los husos neuromusculares y órganos tendinosos de Golgi.
- 3.- Ver si algunas de las mecanoproteínas investigadas se co-expresa en los receptores de propiocepción musculares.

4. Material y técnicas

4. Material y técnicas

4.1. Material

Para la realización del trabajo se utilizó material humano procedente de cadáveres fijados y piezas cadavéricas criopreservadas, no fijadas, obtenidas en el Área de Anatomía y Embriología Humana de la Universidad de Oviedo. Las piezas cadavéricas correspondían a 7 varones y 5 mujeres, de edades comprendidas entre los 61 y 83 años. De todos ellos se obtuvieron 3 músculos lumbricales, 2 músculos interóseos dorsales y 2 músculos interoseos palmares (n = 84). Se seleccionaron estos músculos por su fácil acceso y la abundancia de husos neuromusculares en ellos. El material criopreservado y fresco fue lavado en una solución salina fría durante 1 hora, dividido en segmentos y fijado durante 48 h en formol al 10% tamponado (PBS 0.1M, pH 7,4), posteriormente procesado de forma rutinaria para su inclusión en parafina.

8) Aparte de los músculos, se incluyeron en el estudio ganglios raquídeos cervicales (n = procedentes del Biobanco del grupo de investigación acreditado SINPOS (Registro Nacional de Biobancos, Sección colecciones, Ref. C-0001627). El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Biomédica del Principado de Asturias, España (Cod. CEIm, Past: Proyecto 266/18). Todo el material se obtuvo de acuerdo con la legislación española (RD 1301/2006; Ley 14/2007; DR. 1716/2011; Orden ECC 1414/2013) y las directrices de la Declaración II de Helsinki.

El proceso de inclusión en parafina fue como sigue: las piezas se deshidrataron en una batería de etanoles de gradación creciente (70%: 24 horas; 80%: 1 hora; 90%: 1 hora; 96%: 1 hora; 100%: 1 hora x 3), se diafanizaron en xilol (100%: 30 min x 3) y se pasaron por parafinas blanda (30 min a 55° C) y dura (2 horas a 60° C). Las muestras se cortaron de forma seriada a un grosor de 5 µm y 10 µm con un 49micrótomo convencional (Microm®). Las secciones obtenidas fueron recogidas sobre portaobjetos gelatinizados y secadas en estufa a 45° C durante 24h como mínimo antes de ser utilizadas. Antes de la realización de las diferentes técnicas, se procedió a la desparafinización mediante baños en xilol 100% (20 min x2) y la rehidratación se realizó pasando los cortes por una batería de alcoholes de gradación decreciente (de 10 min cada uno) hasta agua corriente (20 min). A continuación, se seleccionaron algunas secciones para la realización de una tinción

rutinaria de hematoxilina y eosina, con el fin de comprobar la integridad estructural de los tejidos e identificar las estructuras objeto de estudio para la realización de las técnicas de inmunohistoquímica simple o de doble inmunofluorescencia. Los bloques se cortaron a un espesor de 10 µm para los estudios estructural y de inmunohistoquímica y a 40 µm para los estudios de inmunofluorescencia.

4.2. Técnicas

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

La técnica de la hematoxilina-eosina se realizó de manera rutinaria en un procesador automático. Para la realización de la técnica del tricrómico de Masson las secciones hidratadas se pasan por hematoxilina de Weigert (5 min), después se lavan con agua corriente (10 min), seguido de tinción en fucsina de Ponceau (5 min), ácido fosfomolibdico (5 min) y verde luz (5-7 min). Mediante esta técnica el tejido conectivo aparece de color verde, el tejido epitelial del color rojo y el muscular pardo.

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

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

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

Las secciones se contrastaron con hematoxilina, se lavaron en agua, se deshidrataron en una batería de alcohol etílico en concentración creciente, se diafanizaron en xilol y se

montaron con Entellan®. Los controles de la especificidad de la inmunorreacción se realizaron por exclusión del anticuerpo primario o por incubación con suero de conejo no inmune en lugar del anticuerpo primario. En estas condiciones no se observó inmunomarcaje específico.

Tabla 3.1.- Anticuerpos primarios utilizados en el estudio

Antígeno	Especie	Dilución	Obtenido de
PIEZO1	Conejo	1:200	Alomone ¹
PIEZO2	Conejo	1:200	Sigma-Aldrich ²
ASIC2		1:200	Lifespan Biosciences ³
NSE (clone BBS/NC/VI-H14)	Ratón	1:500	Dako ⁴
NFP (clone 2F11)	Ratón	1:200	Roche ⁵
Sinaptofisina (clone 27G12)	Ratón	Prediluido	Leica Biosystems ⁶
S100 P	Ratón	1:500	Dako ⁴
PaV (clone C12)	Ratón	1:200	ThermoFisher ⁷

¹Jerusalem, Israel; ²Saint Louis, MS, USA; ³Seattle, WA, USA; ⁴Glostrup, Denmark; ⁵Viena, Austria; ⁶Madrid, Spain; ⁷

ASIC2: hecho contra un péptido sintético, humano específico.

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: VFGFWAFGKHSAAADITSSLSLSEQVPGPFLVMVLIQFGT MVVD RALYLRK

4.2.3. Técnica de triple inmunofluorescencia

Con el objeto de establecer con exactitud la localización de Piezo2 mecanorreceptoras en las estructuras sensitivas de los músculos cefálicos se realizó doble inmunofluorescencia (más una tercera de contraste mediante DAPI). Las secciones se desparafinaron, hidrataron y lavaron en una solución de TBS (tris buffer solution) a pH 7.4 y las uniones inespecíficas se redujeron mediante incubación durante 30 min en una solución del 5% de albúmina de suero bovino en tampón (TBS, pH 7,4). A continuación se incubaron las secciones durante toda la noche, a 4° C en una cámara húmeda, con una mezcla 1:1 de los siguientes anticuerpos: anti-ASIC2, anti-PIEZO1 y anti-Piezo2 y anti-S100 (Dako, monoclonal, diluido 1:500, que marca las células gliales periféricas); anti-Piezo2 y anti-neurofilamento (Dako, monoclonal, diluido 1:1000); anti-ASIC2 y anti-Piezo2 y anti-

neurofilamento (Dako, monoclonal, diluido 1:1000). Después de un lavado en TBS (15 min en oscuridad), las secciones se incubaron durante 1:30 h con suero de cabra anti-IgG de conejo conjugado CyTM3 (Jackson-ImmunoResearch, Baltimore, MD, EE.UU.) diluido a 1:100 en TBS. A continuación, se volvieron a lavar en el mismo tampón (15 min en oscuridad) y se incubaron durante otra hora con un anticuerpo de asno anti-ratón conjugado y con el fluorocromo Alexafluor-488 (Serotec, Oxford, Reino Unido), diluido al 1:1000 en TBS. Ambos pasos se realizaron a temperatura ambiente en una cámara húmeda oscura. A continuación, se lavaron las secciones (15 min en oscuridad) y finalmente, para verificar detalles estructurales, las secciones se contratiñeron con DAPI Fluoromount –G (Southern Biotech, cat N°0100-20). La doble fluorescencia desarrollada se detectó utilizando un microscopio Leica DMR-XA de fluorescencia automática con Software Leica Confocal, versión 2.5 (Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Alemania). Las imágenes capturadas fueron procesadas con el software “Image J versión 1.43g Master Biophotonics Facility”, Mac Master University Ontario (www.macbiophotonics.ca) (Unidad de Análisis de Imágenes, Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo). Para determinar la especificidad de la inmunofluorescencia, se procesaron secciones representativas de la misma manera utilizando sueros de conejo o ratón no inmunes en lugar de los anticuerpos primarios u omitiendo los anticuerpos primarios en la incubación.

4.2.4. Estudio cuantitativo

Se realizó un análisis de imágenes cuantitativo en ganglios raquídeos de adultos inmunomarcados para la detección de PIEZO1, PIEZO2 y ASIC2 utilizando un sistema automático de análisis de imágenes (Quantimet 550, Leica, Programa QWIN). Se evaluó el porcentaje y tamaño (diámetro medio en μm) de las neuronas inmunorreactivas. Las mediciones se realizaron en 3 secciones por espécimen, separadas por 200 μm para evitar medir la misma neurona dos veces, evaluando cinco campos seleccionados al azar por sección (2,5 mm²). Para la evaluación del tamaño del cuerpo celular solo se consideraron los perfiles neuronales con núcleos aparentes, y las neuronas se dividieron en 7 clases de tamaño, medidas en pasos de 10 μm de diámetro.

5. Resultados

5. Resultados

5.1. Husos neuromusculares

Los husos neuromusculares de los músculos lumbricales e interóseos de la mano humana se disponen en paralelo con las fibras musculares, y están delimitados por una cápsula fina de tejido conectivo que está adherida a las paredes del endomisio y perimisio. Cada uno de ellos está formado por un número variable de fibras musculares intrafusales, la mayoría de ellas del tipo de “en cadena nuclear”; solo en algunos de ellos se han identificado fibras intramusculares del tipo “en saco nuclear”.

La mayoría de las terminaciones de las fibras nerviosas intrafusales en los husos neuromusculares presentaban una disposición anuloespiral, si bien en algunos presentaba una morfología más irregular (Figuras 5.1 y 5.2).

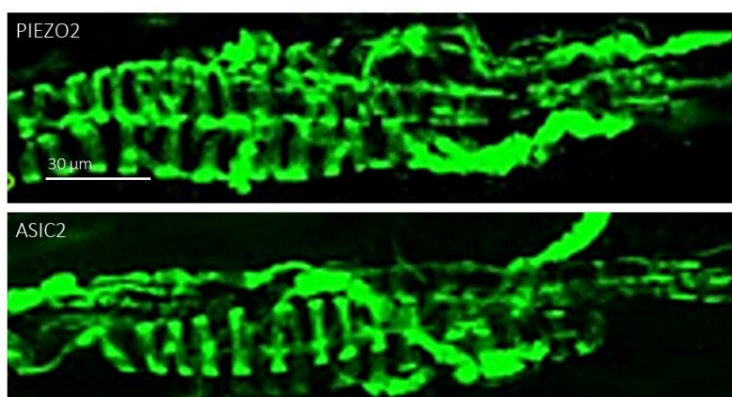


Figura 5.1. Inmunofluorescencia para PIEZO2 y ASIC2 en las fibras nerviosas de husos neuromusculares de los músculos interóseos dorsales de la mano humana. Objetivo: 63X/1.40 oil; pinhole: 1.37; XY resolution: 139.4 nm; and Z resolution: 235.8 nm. La barra de escala es la misma para las dos imágenes.

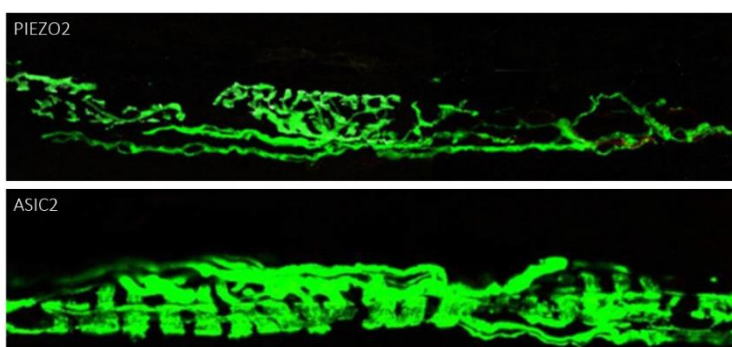


Figura 5.2. Inmunofluorescencia para PIEZO2 y ASIC2 en las fibras nerviosas de husos neuromusculares de los músculos interóseos palmares de la mano humana. Objetivo: 63X/1.40 oil; pinhole: 1.37; XY resolution: 139.4 nm; and Z resolution: 235.8 nm.

Los resultados de los estudios de co-localización de PIEZO2 con la parvalbumina (considerada como el marcador específico para las neuronas de mayor tamaño, es decir los propioceptores) han puesto en evidencia que ambas proteínas se colocan, casi perfectamente en los husos neuromusculares de los músculos estudiados (**Figura 1.3**). La falta de mergencia en algunas zonas de las fibras nerviosas seguramente sea atribuible a factores técnicos y de captación de las imágenes.

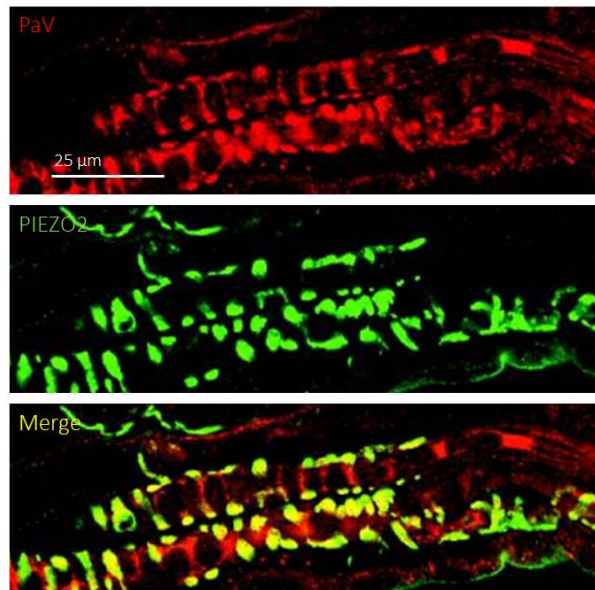


Figura 5.3. Inmunofluorescencia para PIEZO2 (verde) y parvalbumina (rojo) en las fibras nerviosas de husos neuromusculares de los músculos interóseos dorsales de la mano humana. Objetivo: 63X/1.40 oil; pinhole: 1.37; XY resolution: 139.4 nm; and Z resolution: 235.8 nm. La barra de escala es la misma para las dos imágenes.

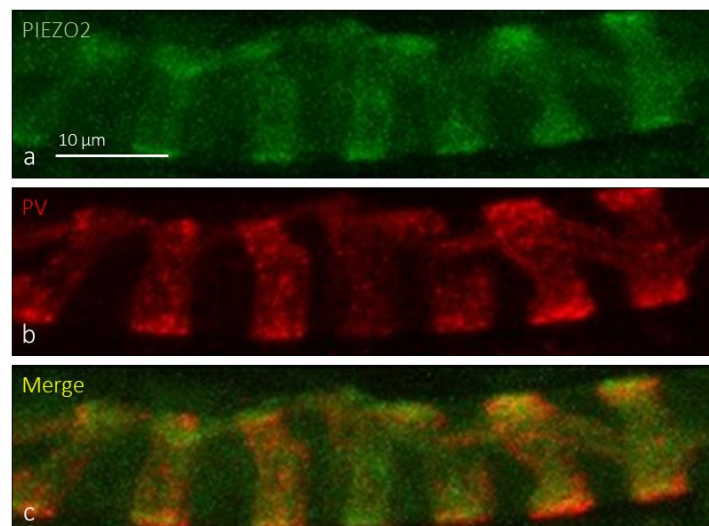


Figura 5.4. Inmunofluorescencia para PIEZO2 (verde) y parvalbumina (rojo) en las fibras nerviosas de husos neuromusculares de los músculos interóseos dorsales de la mano humana. Objetivo: 63X/1.40 oil; pinhole: 1.37; XY resolution: 139.4 nm; and Z resolution: 235.8 nm. La barra de escala es la misma para las dos imágenes.

El análisis de las terminaciones nerviosas anulo-espirales a gran aumento demostró que la inmunofluorescencia para PIEZO2 tiene, aparentemente, localización tanto de membrana como en el axoplasma (**Figura 5.4**).

Por otro lado, PIEZO2 también se co-localiza de forma completamente coincidente con la sinaptofisina en las fibras nerviosas intrafusales (**Figura 5.5**). En estas preparaciones puede apreciarse cómo en las proximidades de los husos neuromusculares hay fibras nerviosas sinaptofisina-positivas y PIEZO2-negativas lo que ratifica la especificidad de la localización de PIEZO2, ya que la sinaptofisina es un marcador universal de las fibras nerviosas sensitivas periféricas.

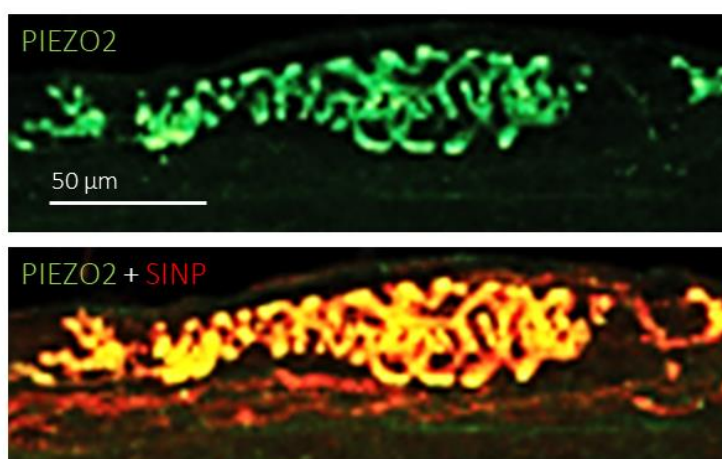


Figura 5.5. Inmunofluorescencia para PIEZO2 (verde) y sinaptofisina (rojo) en las fibras nerviosas de husos neuromusculares de los músculos lumbricales de la mano humana. Objetivo: 63X/1.40 oil; pinhole: 1.37; XY resolution: 139.4 nm; and Z resolution: 235.8 nm. La barra de escala es la misma para las dos imágenes.

Los resultados para PIEZO1 fueron diferentes a los descritos hasta este momento. Las terminaciones anulo-espirales muestran inmunorreacción positiva para la parvalbumina y la sinaptofisina, mientras que el patrón de distribución de los perfiles nerviosos PIEZO1 positivos tenía un trayecto completamente diferente (**Figura 5.6**). Son formaciones lineales que aparentemente se disponen sobre las superficies de las fibras musculares intrafusales y no tienen semejanza con ninguno de los tipos de fibras nerviosas intrafusales conocidos. Dado que no se han realizado estudios de co-localización de PIEZO1 con otros marcadores de fibras nerviosas, la existencia de inervación por fibras PIEZO1 positivas de los husos neuromusculares, al menos para las localizaciones anatómicas estudiadas, debe ser tomada con muchas reservas.

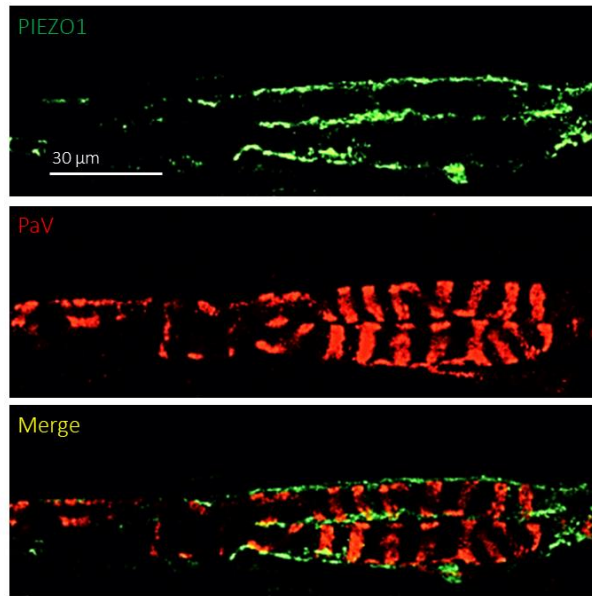


Figura 5.6. Inmunofluorescencia para PIEZO1 (verde) y parvalbumina (rojo) en las fibras nerviosas de husos neuromusculares de los músculos interóseos dorsales de la mano humana. Objetivo: 63X/1.40 oil; pinhole: 1.37; XY resolution: 139.4 nm; and Z resolution: 235.8 nm. La barra de escala es la misma para las dos imágenes.

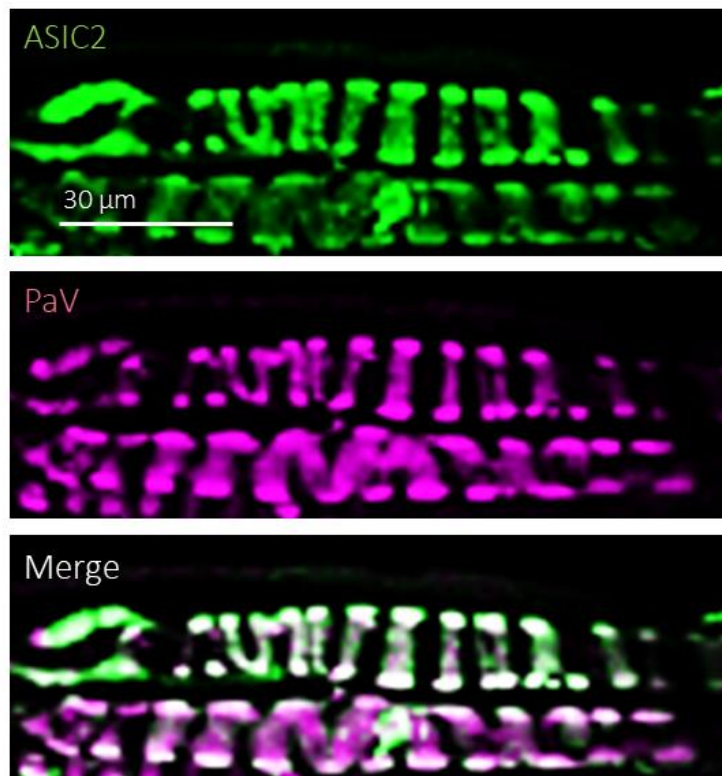


Figura 5.7. Inmunofluorescencia para ASIC2 (verde) y parvalbumina (morado) en las fibras nerviosas de husos neuromusculares de los músculos lumbricales de la mano humana. Objetivo: 63X/1.40 oil; pinhole: 1.37; XY resolution: 139.4 nm; and Z resolution: 235.8 nm. La barra de escala es la misma para las dos imágenes.

En cuanto a la proteína ASIC2, los resultados en los estudios de co-localización con la parvalbumina (**Figura 5.7**) y la sinaptofisina (**Figura 5.8**). las imágenes demuestran que se localiza en las terminaciones anulo-espirales de las fibras nerviosas intrafusales.

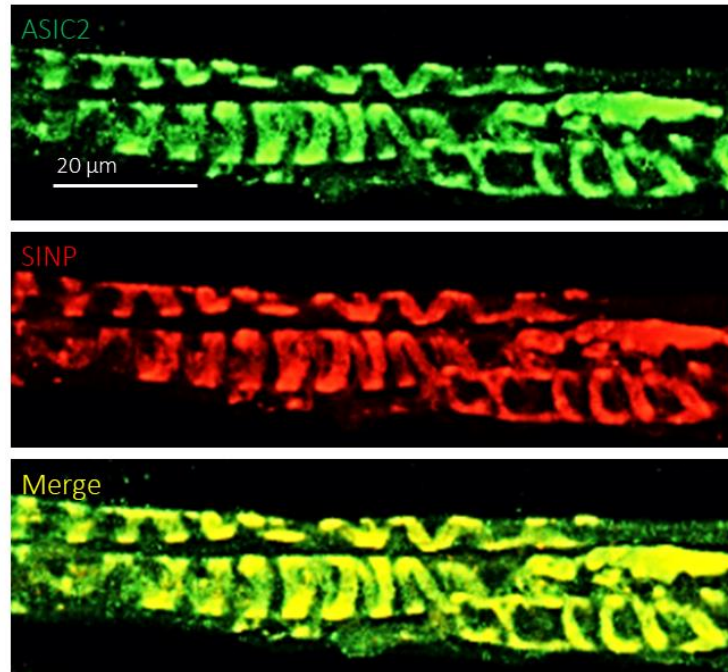


Figura 5.8. Inmunofluorescencia para ASIC2 (verde) y sinaptofisina (rojo) en las fibras nerviosas de husos neuromusculares de los músculos interóseos palmares de la mano humana. Objetivo: 63X/1.40 oil; pinhole: 1.37; XY resolution: 139.4 nm; and Z resolution: 235.8 nm. La barra de escala es la misma para las dos imágenes.

5.2. Propioceptores

La primera aproximación al estudio de los propioceptores de los ganglios raquídeos cervicales humanos consistió en la realización de un estudio de inmunohistoquímica que permitió confirmar que las neuronas más grandes de los mismos son parvalbumina positivos (**Figura 5.9**).

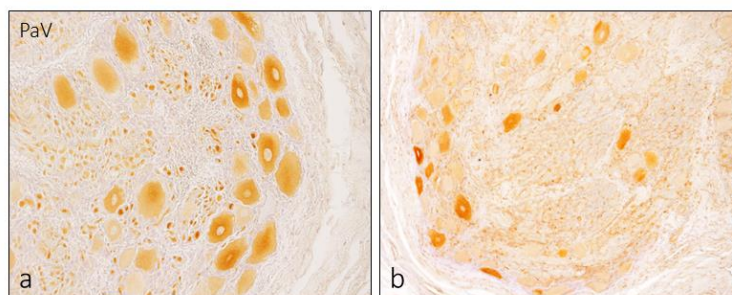


Figura 5.9. Detección inmunohistoquímica de la parvalbumina en los ganglios raquídeos cervicales humanos.

Además, se encontró una población de neuronas sensitivas fuera del rango de tamaño de los propioceptores con reacción positiva para esta proteína (**Tabla 5.1**). En otras palabras, todos los propioceptores son positivos para la parvalbumina, pero hay otras neuronas sensitivas que también expresan esta proteína.

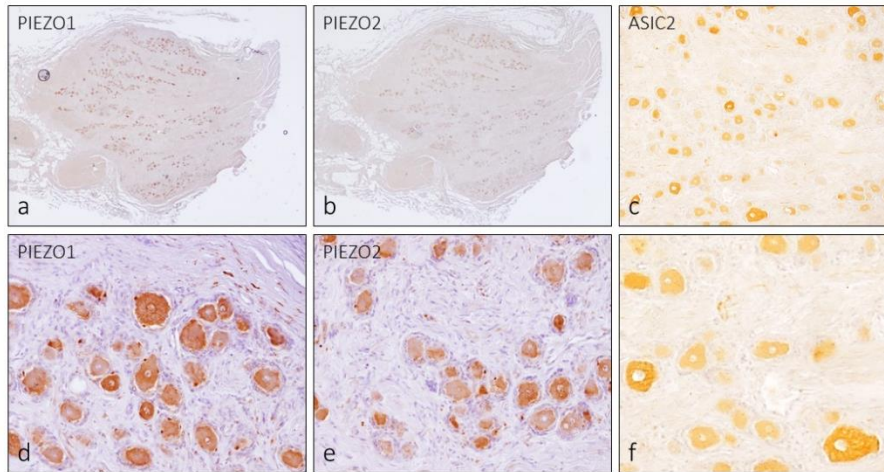


Figura 5.10. Detección inmunohistoquímica de PIEZO1, PIEZO2 y ASIC en los ganglios raquídeos cervicales humanos.

Todas la mecanoproteínas analizadas se detectaron en las neuronas de los ganglios raquídeos, en diferentes porcentajes según la proteína y el rango de tamaño de las neuronas (**Figura 5.10; Tabla 5.1**); todas ella se co-localizaron con la parvalbumina (**Figura 5.11**). distintas poblaciones neuronales

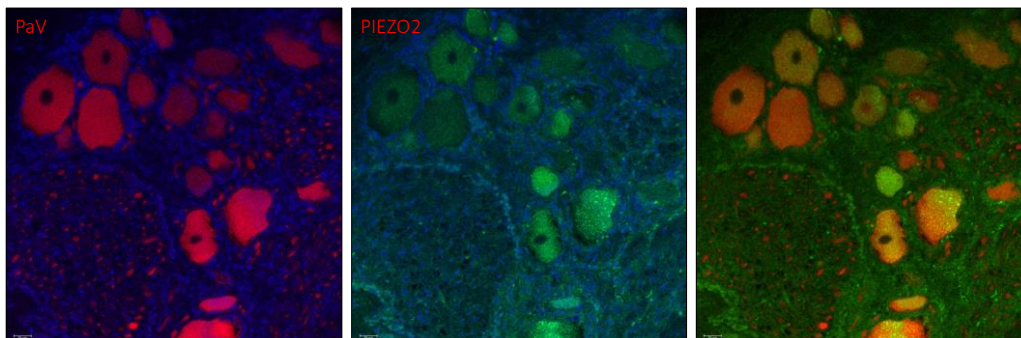


Figura 5.11. Inmunofluorescencia para PIEZO2 (verde) y parvalbumina (rojo) en las neuronas de los ganglios raquídeos cervicales humanos. Objetivo: 63X/1.40 oil; pinhole: 1.37; XY resolution: 139.4 nm; and Z resolution: 235.8 nm. La barra de escala es la misma para las dos imágenes.

La inmunorreacción para PIEZO1, PIEZO2 y ASIC2 se detectó exclusivamente en el soma neuronal mostrando un patrón de distribución citoplasmático difuso, mientras que las células gliales satélite carecían de inmunorreactividad. Las neuronas inmunorreactivas

estaban presentes en distintos porcentajes e incluían todos los rangos de tamaños preestablecidos, a excepción de las neuronas pequeñas que fueron normalmente arreactivas.

Tabla 5.1. Distribución de las neuronas de los ganglios raquídeos cervicales humanos por rangos de tamaños de los somas y porcentajes de neuronas dentro de cada uno de ellos con inmunomarcaje positivo para las mecanoproteínas analizadas.

	<10 μm	11-20 μm	21-30 μm	31-40 μm	41-50 μm	51-60 μm	>60 μm
Distribución	6	31	26	19	8	6	4
PaV	0	0	3	11	6	6	4
PIEZO1	4	27	25	17	7	6	3
PIEZO2	1	13	25	19	7	6	4
ASIC2	0	4	7	13	6	6	4

Finalmente, y aunque no es objetivo directo del presente estudio, la totalidad de las neuronas del ganglio simpático cervical superior, fueron inmunorreactivas para las tres mecanoproteínas estudiadas (**Figura 5.12**).

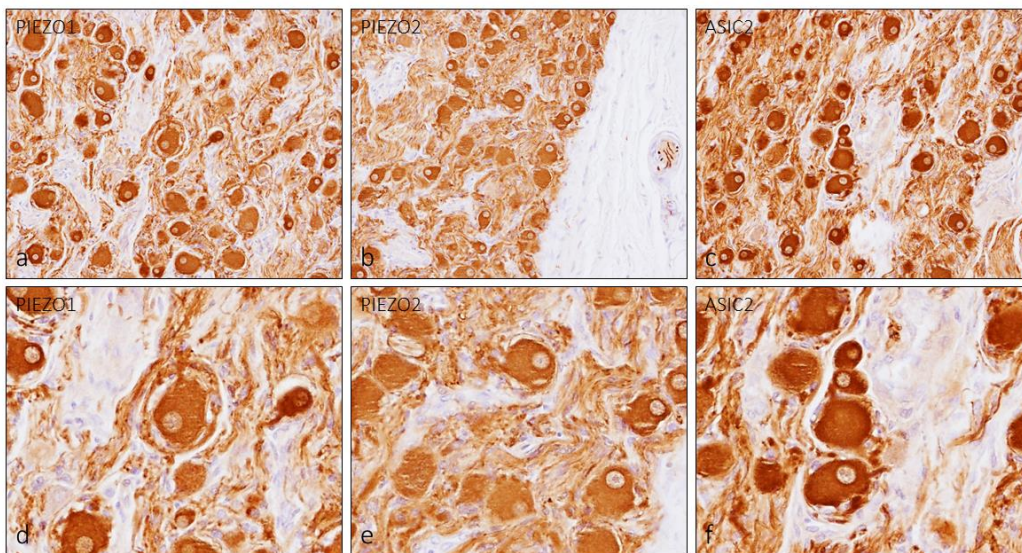


Figura 5.12. Detección inmunohistoquímica de PIEZO1, PIEZO2 y ASIC2 en las neuronas del ganglio simpático cervical superior humano.

6. Discusión

6. Discusión

6.1. Consideraciones generales

El presente trabajo de Tesis Doctoral diseño para estudiar algunos de los aspectos moleculares de la propiocepción en humanos, en base a la detección mediante técnicas de inmunohistoquímica de algunas mecanoproteínas que, en base a los estudios en modelos murinos, intervienen en la propiocepción: PIEZO1, PIEZO2 y ASIC2. El estudio se limita a los músculos cortos intrínsecos de las mano interóseos y lumbricales. Los músculos de mayor volumen, como los de las extremidades, presentan el grave problema de que no se conoce cuál es la distribución de los husos neuromusculares dentro de ellos y es imposible técnicamente manejar volúmenes de tejido tan grandes. Por tanto, el presente trabajo de investigación se limita al territorio de los músculos de la mano antes mencionados y a los ganglios raquídeos cervicales que son los lugares donde se localizan los somas de los propioceptores que los inervan.

El material utilizado en el estudio se obtuvo de cadáveres humanos, fijados y/o preservados para la realización de estudios anatómicos convencionales y no estudios de laboratorio de inervación microscópica. Eso, sin duda, y especialmente en el caso de proteínas tan grandes como las estudiadas, hace que la preservación de las mismas no sea la idónea y pueda interferir con los resultados. Es probable, que los resultados podrían ser mejorables si se hubiera dispuesto de un material idóneo. No obstante, los datos que se obtienen a partir de material humano no necesitan ni traslación ni extrapolación como sucede en los trabajos sobre material de modelos animales.

Respecto a los antígenos de “control” utilizados, la parvalbumina y la sinaptofisina, son en nuestra opinión los mejores para los fines del estudio porque la primera es la proteína ligante del calcio que se considera casi específica de los propioceptores (es decir, de las neuronas de los ganglios raquídeos que inervan los husos neuromusculares) y la segunda marca selectivamente una proteína de membrana de las vesículas sinápticas de la totalidad de los sistemas mecanosensoriales periféricos (García-Mesa et al., 2021).

Por otro lado, los anticuerpos contra las mecanoproteínas estudiadas han mostrado unos resultados consistentes en todos los experimentos. Únicamente hay resultados discordantes entre los hallazgos de PIEZO1 en los propioceptores cervicales que tienen la

proyección periférica esperada en los husos neuromusculares. Y para finalizar esas consideraciones, constatar que los estudios de co-localización de antígenos y la detección de los mismos mediante microscopía confocal apoyada en análisis cuantitativos han permitido establecer la inervación sensitiva-propioceptiva de los husos neuromusculares de algunos músculos humanos.

6.2. Discusión de los resultados

La forma en que el sistema nervioso periférico detecta las señales mecánicas solo se ha establecido en la última década, cuando Coste et al. (2010) identificaron los canales iónicos de la familia PIEZO y establecieron que las proteínas de esa familia, PIEZO1 y PIEZO2 cumplen todos los requisitos para considerarlas como mecanosensibles y ser capaces de realizar el proceso de la mecanotransducción. Pero además de las proteínas PIEZO, hay otras, pertenecientes a distintas familias, que también intervienen en el proceso de la mecanodetección-mecanotransducción; es el caso de ASIC2 (Chen et al., 2018).

Nuestro estudio es, hasta donde nosotros conocemos, el primero que analiza la presencia de ASIC2, PIEZO1 y PIEZO2 en los propioceptores humanos cervicales y en los órganos sensitivos de sus proyecciones periféricas, los husos neuromusculares. Se han excluido de este estudio los órganos tendinosos de Golgi por la escasez en los músculos analizados y la dificultad para su identificación morfológica.

Este trabajo es el primero que estudia en vertebrados la posible expresión de PIEZO1 en las fibras nerviosas intrafusales. Los resultados no han sido concluyentes ya que se ha detectado inmunorreacción para ASIC1 en estructuras intrafusales que no expresan marcadores nerviosos propioceptivos específicos como la parvalbumina, ni generales como la sinaptofisina. Este hecho resulta llamativo si se tiene en consideración que los propioceptores en su totalidad fueron positivos para PIEZO1. Teniendo en cuenta que no es previsible que los propioceptores PIEZO1 positivos proyecten a dianas diferentes de los husos neuromusculares, el problema debe de ser reanalizado completamente en futuros estudios.

Como ya se ha demostrado previamente en modelos animales, PIEZO2 se expresa en los ganglios raquídeos ganglios en todos los tipos conocidos de mecanorreceptores de bajo

umbral (LTMR; Szczot et al., 2017; Nguyen et al., 2017; Zheng et al., 2019; Sharma et al., 2020; von Buchholtz et al., 2020) incluidos los propioceptores que inervan los husos neuromusculares (Woo et al., 2014, 2015). Los presentes resultados confirman para el hombre los estudios previos.

ASIC2 se ha descrito en las neuronas sensitivas espinales del sistema nervioso periférico (Cabo et al., 2015; Wu et al., 2021; Papalampropoulou-Tsiridou et al., 2022) que intervienen en la mecanotransducción (Chen y Wong, 2013; Cheng et al., 2018) incluida la propiocepción, ya que se ha detectado en los husos neuromusculares (Althaus et al., 2007; Chen y Wong, 2009; Simon et al., 2010; Lee y Chen, 2018). Por tanto, nuestros resultados en humanos son completamente coincidentes con los reportados en ratones y ratas, y únicamente confirman en humanos lo que ya se conoce en estos modelos animales.

6.3. Interés clínico de los resultados

Además del interés de los resultados desde la perspectiva de la ciencia básica, la demostración de la propiocepción en humanos este mediada por la mecanoproteína PIEZO2 y, presumiblemente, también ASIC2, tiene interés porque ambos canales iónicos pueden ser dianas terapéuticas. En la actualidad existen fármacos capaces de modular su actividad (Baron y Lingueglia, 2015; De Logu y Geppetti, 2019; Fallah et al., 2022) y ello tiene repercusión no solo para el posible tratamiento de enfermedades que cursen con alteraciones en la propiocepción sino también en situaciones fisiológicas, como es el caso del envejecimiento.

La propiocepción es un factor crítico para la estabilidad y se deteriora en personas mayores (Ribeiro y Oliveira, 2007). De hecho, el sistema propioceptivo sufre importantes cambios estructurales y funcionales con el envejecimiento que provocan una disminución progresiva de la somatosensibilidad, incluida la propiocepción (Verschueren et al., 2002; Landelle et al., 2018; García-Piqueras et al., 2019).

El envejecimiento cursa con debilidad muscular por sarcopenia, disminución del número de fibras intrafusales en husos musculares y denervación. En conjunto, estos hechos conllevan a una disminución de la fuerza muscular y consistentemente la propiocepción, lo que, a su vez, determina el aumento de las caídas en los ancianos con consecuencias

clínicas y de salud pública. La relación específica entre la fuerza muscular y la propiocepción debe explorarse más a fondo, ya que puede proporcionar una base para la afirmación de que el ejercicio mejora la estabilidad de pie. Curiosamente, para lograr una reducción en la incidencia de caídas, no es suficiente mejorar la fuerza muscular por sí sola, ya que se requieren ejercicios que realmente desafían la estabilidad de pie. Estos cambios podrían contribuir a las frecuentes caídas y problemas de control motor que se observan en los adultos mayores. A nivel estructural, los husos musculares en humanos ancianos poseen menos fibras intrafusales, un mayor grosor capsular y algunos husos que muestran signos de denervación (Swash y Fox, 1972; Liu et al., 2005).

Por otro lado, hay una gran variedad de enfermedades neurológicas se caracterizan por movimientos o posturas irregulares y espasmódicas debido a la pérdida de la retroalimentación sensorial propioceptiva, una alteración llamada ataxia aferente. Las neuronas afectadas son neuronas sensoriales primarias en los ganglios raquídeos que transmiten la posición y el movimiento del cuerpo (propiocepción) al sistema nervioso central. La disfunción de la propiocepción puede ser causada por lesiones y trastornos que afectan a cualquier parte del sistema propioceptivo entre los receptores sensoriales que envían las señales a las partes del cerebro que las reciben e interpretan. El riesgo de pérdida de propiocepción aumenta a medida que envejecemos debido a una combinación de cambios naturales relacionados con la edad en los nervios, las articulaciones y los músculos. Ejemplos de lesiones y afecciones que pueden causar déficit propioceptivo incluyen: lesiones cerebrales, hernia de disco, artritis, esclerosis múltiple (EM), accidente cerebrovascular, trastorno del espectro autista (TEA), diabetes, neuropatía periférica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, ELA (esclerosis lateral amiotrófica) o enfermedad de Lou Gehrig.. Las neuronas propioceptivas primarias pueden ser el objetivo de patologías hereditarias, del desarrollo, degenerativas, tóxicas, inflamatorias y autoinmunes. En consecuencia, las consecuencias clínicas típicas de la patología que afecta a las neuronas propioceptivas, además de la ataxia aferente, incluyen la pérdida de los reflejos tendinosos profundos (estiramiento) y de la percepción consciente de la posición y el movimiento de las partes del cuerpo, a menudo asociada con la pérdida de la percepción de la vibración. Recientemente, se han obtenido neuronas sensoriales primarias propioceptivas a partir de iPSCs, y la generación de fibras

intrafusales in vitro está abriendo nuevas perspectivas para el tratamiento de algunas ataxias ligadas a neuronas propioceptivas primarias alteradas (Barret et al., 2020; Dionisi et al., 2020).

6.4. Limitaciones del estudio y futuras investigaciones en el campo

El trabajo de tesis doctoral que se presenta una serie de limitaciones que conviene reseñar. En primer lugar, se limita únicamente a un número muy pequeño de muestras y exclusivamente a músculos de la mano que contienen abundantes husos neuromusculares. La ampliación del estudio a otros músculos de mayor volumen conllevaría conocer previamente la topografía de los husos neuromusculares en ellos.

Por otro lado, el espesor de los cortes utilizados para los estudios de inmunofluorescencia impide captar, ni siquiera con microscopía laser confocal, imágenes nítidas de las fibras nerviosas para intentar una reconstrucción idónea.

También es una limitación de nuestro trabajo la disponibilidad de material en condiciones ideales de estudio. Esta en marcha un proyecto, pendiente de aprobación por el comité de ética para la investigación biomédica, para disponer de tejido muscular de donantes multiorgánicos que, seguramente consentirán obtener mejores resultados.

No obstante, y con carácter general, se han logrados los objetivos propuestos y se ha refrendado la hipótesis de trabajo.

En cuanto a las futuras investigaciones en este campo de la propiocepción, tenemos interés en obtener muestras de ratones con manipulaciones en los genes que codifican para PIEZO2, ya que estos animales presentan ataxia grave, marcha irregular y postura atípica, y sin embargo los receptores periféricos de los propioceptores no están alterados (Woo et al., 2015). Y por supuesto, si es posible, material humano de sujetos con mutaciones en PIEZO2 que cursan con ataxia y dismetría, movimientos corporales severamente descoordinados y posiciones anormales de las extremidades, contractura de múltiples articulaciones y debilidad muscular (Coste et al., 2013; Chesler et al., 2016; Delle Vedove et al., 2016; Haliloglu et al., 2017; Mahmud et al., 2017; Assaraf et al., 2020).

7. Conclusiones

7. Conclusiones

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

- 1.- Los husos neuromusculares de los músculos interóseos y lumbricales de la mano humana están inervados por fibras nerviosas con inmunorreacción positiva para la parvalbumina (específica de los propioceptores) y la sinaptofisina.
- 2.- Las fibras nerviosas intrafusales de los husos neuromusculares de los músculos interóseos y lumbricales de la mano humana expresan las mecanoproteínas PIEZO2 y ASIC2.
- 3.- El patrón de expresión de PIEZO1 en los husos neuromusculares de los músculos interóseos y lumbricales de la mano humana no es compatible con inervación propioceptora de las fibras intrafusales.
- 4.- En base a la distribución de los tamaños de los somas neuronales, los ganglios raquídeos cervicales contienen un 18% de propioceptores, que son todos parvalbumina positivos.
- 5.- Los propioceptores de los ganglios raquídeos cervicales humanos expresan las mecanoproteínas PIEZO1, PIEZO2 y ASIC2.

8. Bibliografía

8. Bibliografia

- Akay T, Tourtellotte WG, Arber S, Jessell TM. Degradation of mouse locomotor pattern in the absence of proprioceptive sensory feedback. *PNAS USA*. 2014; 111:16877-16882.
- Alisch F, Weichert A, Kalache K, Paradiso V, Longardt AC, Dame C, Hoffmann K, Horn D. Familial Gordon syndrome associated with a PIEZO2 mutation. *Am J Med Genet A*. 2017; 173: 254-259.
- Anderson EO, Schneider ER, Bagriantsev SN. Piezo2 in Cutaneous and Proprioceptive Mechanotransduction in Vertebrates. *Curr Top Membr*. 2017; 79: 197-217.
- Alper SL. Genetic Diseases of PIEZO1 and PIEZO2 Dysfunction. *Curr Top Membr*. 2017; 79:97-134.
- Althaus M, Bogdan R, Clauss WG, Fronius M. Mechano-sensitivity of epithelial sodium channels (ENaCs): laminar shear stress increases ion channel open probability. *FASEB J*. 2007; 21:2389–2399.
- Anderson EO, Schneider ER, Bagriantsev SN. Piezo2 in Cutaneous and Proprioceptive Mechanotransduction in Vertebrates. *Curr Top Membr*. 2017; 79: 197-217.
- Assaraf E, Blecher R, Heinemann-Yerushalmi L, Krief S, Carmel Vinestock R, Biton IE, Brumfeld V, Rotkopf R, Avisar E, Agar G, Zelzer E. Piezo2 expressed in proprioceptive neurons is essential for skeletal integrity. *Nat Commun*. 2020; 11: 3168.
- Bagriantsev SN, Gracheva EO, Gallagher PG. Piezo proteins: regulators of mechanosensation and other cellular processes. *J Bio. Chem*. 2014; 289: 31673-31681.
- Banks RW. The motor innervation of mammalian muscle-spindles. *Prog Neurobiol*. 1994;43: 323-362.
- Banks RW. The muscle spindle. In: Dyck PJ, Thomas PK, editors. *Peripheral neuropathy*. 4. Philadelphia: WB Saunders; 2005. pp. 131–150.
- Banks RW. The innervation of the muscle spindle: a personal history. *J Anat*. 2015; 227: 115-135.
- Banks RW, Harker DW, Stacey MJ. A study of mammalian intrafusal muscle fibres using a combined histochemical and ultrastructural technique. *J Anat*. 1977; 123: 783-796.
- Banks RW, Hulliger M, Saed HH, Stacey MJ. A comparative analysis of the encapsulated end-organs of mammalian skeletal muscles and of their sensory nerve endings. *J Anat*. 2009; 214: 859-887.
- Baron A, Lingueglia E. Pharmacology of acid-sensing ion channels- physiological and therapeutical perspectives. *Neuropharmacology*. 2015; 94:19-35.
- Barret P, Quick TJ, Mudera V, Player DJ. Generating intrafusal skeletal muscle fibres in vitro: Current state of the art and future challenges. *J Tissue Eng*. 2020; 11: 1-15.

- Bewick GS, Banks RW. Mechanotransduction in the muscle spindle. *Pflugers Arch*. 2015; 467:175-90.
- Blecher R, Heinemann-Yerushalmi L, Assaraf E, Konstantin N, Chapman JR, Cope TC, Bewick GS, Banks RW, Zelzer E. New functions for the proprioceptive system in skeletal biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2018; 373 (1759). pii: 20170327.
- Bornstein B, Watkins B, Passini FS, Blecher R, Assaraf E, Sui XM, Brumfeld V, Tsoory M, Kröger S, Zelzer E. The mechanosensitive ion channel ASIC2 mediates both proprioceptive sensing and spinal alignment. *Exp Physiol*. 2023; doi: 10.1113/EP090776.
- Bagriantsev SN, Gracheva EO, Gallagher PG. Piezo proteins: regulators of mechanosensation and other cellular processes. *J Biol Chem*. 2014; 289: 31673-31681.
- Burke D, Gandevia SC, Macefield G. Responses to passive movement of receptors in joint, skin and muscle of the human hand. *J Physiol*. 1988; 402: 347-361.
- Butler AA, Héroux ME, Gandevia SC. Body ownership and a new proprioceptive role for muscle spindles. *Acta Physiol (Oxf)* 2016; 220: 19-27.
- Cabo R, Alonso P, Viña E, Vázquez G, Gago A, Feito J, Pérez-Moltó FJ, García-Suárez O, Vega JA. ASIC2 is present in human mechanosensory neurons of the dorsal root ganglia and in mechanoreceptors of the glabrous skin. *Histochem Cell Biol*. 2015; 143: 267-276.
- Cheng YR, Jiang BY, Chen CC. Acid-sensing ion channels: dual function proteins for chemosensing and mechano-sensing. *J Biomed Sci*. 2018; 25: 46.
- Chen CC, Wong CW. Neurosensory mechanotransduction through acid-sensing ion channels. *J Cell Mol Med*. 2013 ;17: 337-349.
- Cheng YR, BY, Chen CC. Acid-sensing ion channels: dual function proteins for chemosensing and mechano-sensing. *J Biomed Sci*. 2018; 25: 46.
- 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.
- Chiu IM, Barrett LB, Williams EK, Strohlic DE, Lee S, Weyer AD, Lou S, Bryman GS, Roberson DP, Ghasemlou N, Piccoli C, Ahat E, Wang V, Cobos EJ, Stucky CL, Ma Q, Liberles SD, Woolf CJ. Transcriptional profiling at whole population and single cell levels reveals somatosensory neuron molecular diversity. *Elife*. 2014; 3:e04660.
- Ciancia F, Maitte M, Coquery JM. Reduction during movement of the evoked potentials recorded along the extralemniscal pathways of the cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1980; 48: 197-202.

- Cobo JL, Abbate F, de Vicente JC, Cobo J, Vega JA. Searching for proprioceptors in human facial muscles. *Neurosci Lett*. 2017; 640:1-5.
- Cobo JL, Solé-Magdalena A, Junquera S, Cobo T, Vega JA, Cobo J. The Proprioception in the Muscles Supplied by the Facial Nerve. In: *Selected Topics in Facial Nerve Disorders*, I. Al-Zwaini and M.J Hussein Eds. InTechOpen, London, 2019, pp. 15.28.
- 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(17). pii: E6221.
- Cobo R, García-Piqueras J, Cobo J, Vega JA. The Human Cutaneous Sensory Corpuscles: An Update. *J Clin Med*. 2021; 10(2). pii: E227.
- Collins DF, Prochazka A. Movement illusions evoked by ensemble cutaneous input from the dorsum of the human hand. *J Physiol*. 1996; 496: 857-871.
- Coste B, Houge G, Murray MF, Stitzel N, Bandell M, Giovanni MA, Philippakis A, Hoischen A, Riemer G, Steen U, Steen VM, Mathur J, Cox J, Lebo M, Rehm H, Weiss ST, Wood JN, Maas RL, Sunyaev SR, Patapoutian A. Gain-of-function mutations in the mechanically activated ion channel PIEZO2 cause a subtype of Distal Arthrogyrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110: 4667-4672.
- Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Patapoutian A. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science*. 2010; 330: 55-60.
- Coste B, Murthy SE, Mathur J, Schmidt M, Mechoukhi Y, Delmas P, Patapoutian A. Piezo1 ion channel pore properties are dictated by C-terminal region. *Nat Commun*. 2015; 6:7223.
- Delmas P, Coste B. Mechano-gated ion channels in sensory systems. *Cell*. 2013; 155:278-284.
- Del Valle ME, Cobo T, Cobo JL, Vega JA. Mechanosensory neurons, cutaneous mechanoreceptors, and putative mechanoproteins. *Microsc Res Tech*. 2012; 75:1033-1043.
- Delle Vedove A, Storbeck M, Heller R, Hölker I, Hebbbar M, Shukla A, Magnusson O, Cirak S, Girisha KM, O'Driscoll M, Loeys B, Wirth B. Biallelic loss of proprioception-related PIEZO2 causes muscular atrophy with perinatal respiratory distress, arthrogyrosis, and scoliosis. *Am J Hum Genet*. 2016; 99:1206-16.
- Dijkerman HC, de Haan EH. Somatosensory processes subserving perception and action. *Behav Brain Sci*. 2007; 30:189-201.
- Dionisi C, Rai M, Chazalon M, Schiffmann SN, Pandolfo M. Primary proprioceptive neurons from human induced pluripotent stem cells: a cell model for afferent ataxias. *Sci Rep*. 2020; 10: 7752.

- Edin BB. Quantitative analyses of dynamic strain sensitivity in human skin mechanoreceptors. *J Neurophysiol.* 2004; 92: 3233-3243.
- Edin BB, Vallbo AB. Dynamic response of human muscle spindle afferents to stretch. *J Neurophysiol.* 1990a; 63: 1297-1306.
- Ellaway PH, Taylor A, Durbaba R. Muscle spindle and fusimotor activity in locomotion. *J Anat.* 2015; 227:157-166.
- Faucherre A, Nargeot J, Mangoni ME, Jopling C. piezo2b regulates vertebrate light touch response. *J Neurosci.* 2013; 33:17089-1709494.
- Feng J, Luo J, Yang P, Du J, Kim BS, Hu H. Piezo2 channel–Merkel cell signaling modulates the conversion of touch to itch. *Science* 2018; 360:530-333.
- Ferrari LF, Bogen O, Green P, Levine JD. Contribution of Piezo2 to endothelium-dependent pain. *Molecular Pain.* 2015; 11:65.
- Florez-Paz D, Bali KK, Kuner R, Gomis A. A critical role for Piezo2 channels in the mechanotransduction of mouse proprioceptive neurons. *Sci Rep.* 2016; 6:25923.
- Frith C. The self in action: lessons from delusions of control. *Consciousness Cognition.* 2005; 14: 752-770.
- Gandevia SC, Miller S, Aniss AM, Burke D. Reflex influences on muscle spindle activity in relaxed human leg muscles. *J Neurophysiol.* 1986; 56: 159-170.
- Gannon KP, McKey SE, Stec DE, Drummond HA. Altered myogenic vasoconstriction and regulation of whole kidney blood flow in the ASIC2 knockout mouse. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015; 308: F339-F348.
- García-Añoveros J, Samad TA, Zúvela-Jelaska L, Woolf CJ, Corey DP. Transport and localization of the DEG/ENaC ion channel BNaC1alpha to peripheral mechanosensory terminals of dorsal root ganglia neurons. *J Neurosci.* 2001; 21: 2678-2686.
- García-Mesa Y, Cárcaba L, Coronado C, Cobo R, Martín-Cruces J, García-Piqueras J, Feito J, García-Suárez O, Vega JA. Glans clitoris innervation: PIEZO2 and sexual mechanosensitivity. *J Anat.* 2021; 238: 446-454.
- García-Mesa Y, Feito J, Cuendias P, García-Piqueras J, Germanà A, García-Suárez O, Martín-Biedma B, Vega JA. The acquisition of mechanoreceptive competence by human digital Merkel cells and sensory corpuscles during development: An immunohistochemical study of PIEZO2. *Ann Anat.* 2022; 243: 151953.
- García-Mesa Y, García-Piqueras J, García B, Feito J, Cabo R, Cobo J, Vega JA, García-Suárez O. Merkel cells and Meissner's corpuscles in human digital skin display Piezo2 immunoreactivity. *J Anat.* 2017; 231:978-989.
- García-Mesa Y, García-Piqueras J, Cobo R, Martín-Cruces J, Suazo I, García-Suárez O, Feito J, Vega JA. Sensory innervation of the human male prepuce: Meissner's corpuscles predominate. *J Anat.* 2021; 239: 892-902.

- García-Piqueras J, García-Mesa Y, Cárcaba L, Feito J, Torres-Parejo I, Martín-Biedma B, Cobo J, García-Suárez O, Vega JA. Ageing of the somatosensory system at the periphery: age-related changes in cutaneous mechanoreceptors. *J Anat.* 2019; 234: 839-852.
- Gautam M, Benson CJ. Acid-sensing ion channels (ASICs) in mouse skeletal muscle afferents are heteromers composed of ASIC1a, ASIC2, and ASIC3 subunits. *FASEB J.* 2013; 27:793-802.
- Ge J, Li W, Zhao Q, Li N, Chen M, Zhi P, Li R, Gao N, Xiao B, Yang M. Architecture of the mammalian mechanosensitive Piezo1 channel. *Nature.* 2015; 527: 64-69.
- Grigg P. Peripheral neural mechanisms in proprioception. *J Sport Rehab.* 1994; 3: 2-17.
- Haliloglu G, Becker K, Temucin C, Talim B, Küçükşahin N, Pergande M, Motameny S, Nürnberg P, Aydingoz U, Topaloglu H, Cirak S. Recessive PIEZO2 stop mutation causes distal arthrogryposis with distal muscle weakness, scoliosis and proprioception defects. *J Hum Genet.* 2017; 62:597-501.
- Handler A, Ginty DD. 2021. The mechanosensory neurons of touch and their mechanisms of activation. *Nat Rev Neurosci.* 2021; 22: 521-537.
- Handler A, Zhang Q, Pang S, Nguyen TM, Iskols M, Nolan-Tamariz M, Cattel S, Plumb, R, Sanchez B, Ashjian K, Shotland A, Brown B, Kabeer M, Turecek J, DeLisle MM, Rankin G, Xiang W, Pavarino EC, Africawala N, Santiago C, Le WA, Xu CS, Ginty DD. Three-dimensional reconstructions of mechanosensory end organs suggest a unifying mechanism underlying dynamic, light touch. *Neuron.* 2023; S0896-6273(23)00634-7.
- Hildebrand MS, de Silva MG, Klockars T, Rose E, Price M, Smith RJ, McGuirt WT, Christopoulos H, Petit C, Dahl HH. Characterisation of DRASIC in the mouse inner ear. *Hear Res.* 2004; 190: 149-160.
- Hippenmeyer S, Vrieseling E, Sigrist M, Portmann T, Laengle C, Ladle DR, Arber S.. A Developmental Switch in the Response of DRG Neurons to ETS Transcription Factor Signaling. *Plos Biol.* 2005; 3: e159.
- Hockley JRF, Taylor TS, Callejo G, Wilbrey AL, Gutteridge A, Bach K, Winchester WJ, Bulmer DC, McMurray G, Smith ESJ. Single-cell RNAseq reveals seven classes of colonic sensory neuron. *Gut.* 2019; 68: 633-644.
- 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.
- Huang H, Bae C, Sachs F, Suchyna TM. Caveolae regulation of mechanosensitive channel function in myotubes. *PLoS One.* 2013; 8:e72894.
- Hung CH, Chin Y, Fong YO, Lee CH, Han DS, Lin JH, Sun WH, Chen CC. Acidosis-related pain and its receptors as targets for chronic pain. *Pharmacol Ther.* 2023; 247: 108444.

- Hunt CC, Wilkinson RS, Fukami Y. Ionic basis of the receptor potential in primary endings of mammalian muscle spindles. *J Gen Physiol.* 1978; 71:683-698.
- Ichikawa H, Sugimoto T. The co-expression of ASIC3 with calcitonin gene-related peptide and parvalbumin in the rat trigeminal ganglion. *Brain Res.* 2002; 943: 287-291.
- Ikeda R, Cha M, Ling J, Jia Z, Coyle D, Gu JG. Merkel cells transduce and encode tactile stimuli to drive A β -afferent impulses. *Cell* 2014; 157:664-675.
- Ismailov II, Berdiev BK, Shlyonsky VG, Benos DJ. Mechanosensitivity of an epithelial Na⁺ channel in planar lipid bilayers: release from Ca²⁺ block. *Biophys J.* 1997; 72:1182-1192.
- Izumizaki M, Tsuge M, Akai L, Proske U, Homma I. The illusion of changed position and movement from vibrating one arm is altered by vision or movement of the other arm. *J Physiol.* 2010; 588: 2789-2800.
- Jami L. Golgi tendon organs in mammalian skeletal muscle: functional properties and central actions. *Physiol Rev.* 1992; 72: 623-666.
- Johansson RS, Flanagan JR. Coding and use of tactile signals from the fingertips in object manipulation tasks. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10: 345-359.
- Khatibi Shahidi M, Krivanek J, Kaukua N, Ernfors P, Hladik L, Kostal V, Masich S, Hampl A, Chubanov V, Gudermann T, Romanov RA, Harkany T, Adameyko I, Fried K. Three-dimensional Imaging Reveals New Compartments and Structural Adaptations in Odontoblasts. *J Dent Res.* 2015; 94:945-954.
- Kim SE, Coste B, Chadha A, Cook B, Patapoutian A. The role of Drosophila Piezo in mechanical nociception. *Nature* 2012; 483:209-212
- Kistemaker DA, Van Soest AJ, Wong JD, Kurtzer I, Gribble PL. Control of position and movement is simplified by combined muscle spindle and Golgi tendon organ feedback. *J Neurophysiol.* 2013; 109:1126-1139.
- Kobayashi H, Yoshiyama M, Zakoji H, Takeda M, Araki I. Sex differences in the expression profile of acid-sensing ion channels in the mouse urinary bladder: a possible involvement in irritative bladder symptoms. *BJU Int.* 2009; 104: 1746-1751.
- Kröger S. Proprioception 2.0: novel functions for muscle spindles. *Curr Opin Neurol.* 2018; 31:592-598.
- Kröger S, Watkins B. Muscle spindle function in healthy and diseased muscle. *Skelet Muscle.* 2021; 11:3.
- Kucera J, Dorovini-Zis K. Types of human intrafusal muscle fibers. *Muscle Nerve.* 1979; 2:437-451.
- Kulkarni V, Chandy MJ, Babu KS: Quantitative study of muscle spindles in suboccipital muscles of human foetuses. *Neurol India.* 2001; 49: 355-359.

- Kupari J, Häring M, Agirre E, Castelo-Branco G, Ernfors P. 2019. An atlas of vagal sensory neurons and their molecular specialization. *Cell Rep.* 2019; 27:2508–23.e4.
- Landelle C, El Ahmadi A, Kavounoudias A. Age-related impairment of hand movement perception based on muscle proprioception and touch. *Neuroscience.* 2018; 381:91-104.
- Lee CH, Chen CC. Roles of ASICs in Nociception and Proprioception. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1099: 37-47.
- Lee W, Leddy HA, Chen Y, Lee SH, Zelenski NA, McNulty AL, Wu J, Beicker KN, Coles J, Zauscher S, Grandl J, Sachs F, Guilak F, Liedtke WB. Synergy between Piezo1 and Piezo2 channels confers high-strain mechanosensitivity to articular cartilage. *PNAS USA* 2014; 111: E5114–E5122.
- Li J, Hou B, Tumova S, Muraki K, Bruns A, Ludlow MJ, Sedo A, Hyman AJ, McKeown L, Young RS, Yuldasheva NY, Majeed Y, Wilson LA, Rode B, Bailey MA, Kim HR, Fu Z, Carter DA, Bilton J, Imrie H, Ajuh P, Dear TN, Cubbon RM, Kearney MT, Prasad RK, Evans PC, Ainscough JF, Beech DJ. Piezo1 integration of vascular architecture with physiological force. *Nature.* 2014; 515:279-282.
- Lin YW, Cheng CM, Leduc PR, Chen CC. Understanding sensory nerve mechanotransduction through localized elastomeric matrix control. *PLoS ONE* 2009; 4: e4293.
- Lin JH, Hung CH, Han DS, Chen ST, Lee CH, Sun WZ, Chen CC. Sensing acidosis: nociception or sngception? *J Biomed Sci.* 2018; 25: 85.
- Lin YC, Lee CH, Sung JY, Chen CC. Genetic exploration of roles of acid-sensing ion channel subtypes in neurosensory mechanotransduction including proprioception. *Exp Physiol.* 2023 Jul 25. doi: 10.1113/EP090762.
- Lin SH, Sun WH, Chen CC. Genetic exploration of the role of acid-sensing ion channels. *Neuropharmacology.* 2015; 94: 99-118.
- Liu J-X, Eriksson PO, Thornell L-E, Pedrosa-Domellof F. Myosin heavy chain composition of muscle spindles in human biceps brachii, *J Histochem Cytochem.* 2002; 50:171-184.
- Liu J-X, Thornell L-E, Pedrosa-Domellof F. Muscle spindles in the deep muscles of the human neck: a morphological and immunocytochemical study. *J Histochem Cytochem.* 2003; 51: 175-186.
- Liu J-X, Eriksson PO, Thornell L-E, Pedrosa-Domellof F. Fiber content and myosin heavy chain composition of muscle spindles in aged human biceps brachii. *J Histochem Cytochem.* 2005; 53: 445-454.
- 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.

- Ma S, Dubin AE, Romero LO, Loud M, Salazar A, Chu S, Klier N, Masri S, Zhang Y, Wang Y, Chesler AT, Wilkinson KA, Vásquez V, Marshall KL, Patapoutian A. Excessive mechanotransduction in sensory neurons causes joint contractures. *Science*. 2023; 379: 201-206.
- Macefield VG, Knellwolf TP. Functional properties of human muscle spindles. *J Neurophysiol*. 2018; 120: 452-467.
- Mahmud AA, Nahid NA, Nassif C, Sayeed MS, Ahmed MU, Parveen M, Khalil MI, Islam MM, Nahar, Z, Rypens F, Hamdan FF, Rouleau GA, Hasnat A, Michaud JL. Loss of the proprioception and touch sensation channel PIEZO2 in siblings with a progressive form of contractures. *Clin Genet*. 2017; 91:470-5.
- Maksimovic S, Nakatani M, Baba Y, Nelson AM, Marshall KL, Wellnitz SA, Firozi P, Woo SH, Ranade S, Patapoutian A, Lumpkin EA. Epidermal Merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors. *Nature*. 2014; 509:617-621.
- Manuel M, Zytnecki D. Alpha, beta and gamma motoneurons: functional diversity in the motor system's final pathway. *J Integr Neurosci*. 2011; 10: 243-276.
- Marasco PD, de Nooij JC. Proprioception: A New Era Set in Motion by Emerging Genetic and Bionic Strategies? *Annu Rev Physiol*. 2023; 85:1-24.
- Marmigère F, Ernfors P. Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. *Nat Rev Neurosci*. 2007; 8: 114-127.
- Marshall KL, Saade D, Ghitani N, Coombs AM, Szczot M, Keller J, Ogata T, Daou I, Stowers LT, Bönnemann CG, Chesler AT, Patapoutian A. PIEZO2 in sensory neurons and urothelial cells coordinates urination. *Nature*. 2020; 588: 290-295.
- Martín-Cruces J, Martín-Biedma B, García-Mesa Y, Cuendias P, Gaité JJ, García-Suárez O, Cobo JL, Vega JA. 2023. Exploring somatosensory innervation of the human lip: A focus on the vermillion. *Ann Anat*. 23023; 250:152-159.
- Martinac B. The ion channels to cytoskeleton connection as potential mechanism of mechanosensitivity. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1838:682-691.
- Matthews PB. Where Anatomy led, Physiology followed: a survey of our developing understanding of the muscle spindle, what it does and how it works. *J Anat*. 2015;227: 104-114.
- McMillin MJ, Beck AE, Chong JX, Shively KM, Buckingham KJ, Gildersleeve HI, Arcena MI, Aylsworth AS, Bitoun P, Carey JC, Clericuzio CL, Crow YJ, Curry CJ, Devriendt K, Everman DB, Fryer A, Gibson K, Giovannucci Uzielli ML, Graham JM Jr, Hall JG, Hecht JT, Heidenreich RA, Hurst JA, Irani S, Krapels IP, Leroy JG, Mowat D, Plant GT, Robertson SP, Schorry EK, Scott RH, Seaver LH, Sherr E, Splitt M, Stewart H, Stumpel C, Temel SG, Weaver DD, Whiteford M, Williams MS, Tabor HK, Smith JD, Shendure J, Nickerson DA; University of Washington Center for Mendelian Genomics, Bamshad MJ. Mutations in

- PIEZO2 cause Gordon syndrome, Marden-Walker syndrome, and distal arthrogryposis type 5. *Am J Hum Genet.* 2014; 94:734-744.
- 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.
- Meng F, Sachs F. Orientation-based FRET sensor for real-time imaging of cellular forces. *J Cell Sci.* 2012; 125:743-750.
- Miglis MG, Muppidi S. Ion channels PIEZO2s identified as the long-sought baroreceptor mechanosensors for blood pressure control, and other updates on autonomic research. *Clin Auton Res.* 2019; 29: 9-11.
- Mileusnic MP, Loeb GE. Mathematical models of proprioceptors. II Structure and function of the Golgi tendon organ, *J Neurophysiol.* 2006; 96:1789-1802.
- 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.
- Moayed Y, Duenas-Bianchi LF, Lumpkin EA. 2018. Somatosensory innervation of the oral mucosa of adult and aging mice. *Sci Rep.* 2018; 8: 9975.
- 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.
- Morris CE. Voltage-gated channel mechanosensitivity: fact or friction? *Front Physiol.* 2011; 2:25. 40.
- Morris CE. Why are so many ion channels mechanosensitive? In: Sperelakis N, editor. *Cell Physiology Source Book.* Elsevier; 2012. pp. 493-505. Ç
- Morrison PE, Hill RV. And then there were four: Anatomical observations on the pollical palmar interosseous muscle in humans. *Clin Anat.* 2011; 24: 978-983.
- Murthy SE, Dubin AE, Patapoutian A. Piezos thrive under pressure: mechanically activated ion channels in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017; 18:771-83.
- Murthy SE, Loud MC, Daou I, Marshall KL, Schwaller F, Kühnemund J, Francisco AG, Keenan WT, Dubin AE, Lewin GR, Patapoutian A. The mechanosensitive ion channel Piezo2 mediates sensitivity to mechanical pain in mice. *Sci Transl Med.* 2018; 10(462):eaat9897.
- Nagel M, Chesler AT. PIEZO2 ion channels in proprioception. *Curr Opin Neurobiol.* 2022; 75: 102572.
- Nakamura M, Jang IS. Characterization of proton-induced currents in rat trigeminal mesencephalic nucleus neurons. *Brain Res.* 2014; 1583:12-22.

- Nguyen MQ, Wu Y, Bonilla LS, von Buchholtz LJ, Ryba NJ. Diversity amongst trigeminal neurons revealed by high throughput single cell sequencing. *PLOS ONE* 2017; 12:e0185543.
- 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.
- Oliver KM, Florez-Paz DM, Badea TC, Mentis GZ, Menon V, de Nooij JC. Molecular correlates of muscle spindle and Golgi tendon organ afferents. *Nat Commun*. 2021; 12: 1451.
- Omerbasic D, Schuhmacher LN, Bernal Sierra YA, Smith ES, Lewin GR. ASICs and mammalian mechanoreceptor function. *Neuropharmacology*. 2015; 94:80-86.
- Ovalle WK, Smith RS: Histochemical identification of three types of intrafusal muscle fibers in cat and monkey based on myosin ATPase reaction *Can J Physiol Pharmacol*. 1972; 50:195-202. Proske U. The tendon organ. In: *Peripheral Neuropathy*, edited by Dyck P, Thomas P, Griffin J, Low P, Poduslo J. Philadelphia, PA: Saunders, 1993, p. 141-148.
- Page AJ, Brierley SM, Martin CM, Price MP, Symonds E, Butler R, Wemmie JA, Blackshaw LA. Different contributions of ASIC channels 1a, 2, and 3 in gastrointestinal mechanosensory function. *Gut*. 2005; 54: 1408-1415.
- Papalamproulou-Tsiridou M, Shiers S, Wang F, Godin AG, Price TJ, De Koninck Y. Distribution of acid-sensing ion channel subunits in human sensory neurons contrasts with that in rodents. *Brain Commun*. 2022; 4(6):fcac256.
- Peng BG, Ahmad S, Chen S, Chen P, Price MP, Lin X. Acid-sensing ion channel 2 contributes a major component to acid-evoked excitatory responses in spiral ganglion neurons and plays a role in noise susceptibility of mice. *J Neurosci*. 2004; 24: 10167-10175.
- Peng Z, Li WG, Huang C, Jiang YM, Wang X, Zhu MX, Cheng X, Xu TL. ASIC3 Mediates Itch Sensation in Response to Coincident Stimulation by Acid and Nonproton Ligand. *Cell Rep*. 2015; 13: 387-398.
- Poliak S, Norovich AL, Yamagata M, Sanes JR, Jessell TM. Muscle-type Identity of Proprioceptors Specified by Spatially Restricted Signals from Limb Mesenchyme. *Cell* 2016; 164: 512-525.
- Prescott SL, Umans BD, Williams EK, Brust RD, Liberles SD. An airway protection program revealed by sweeping genetic control of vagal afferents. *Cell* 2020; 181:574-589.
- Price MP, McIlwrath SL, Xie J, Cheng C, Qiao J, Tarr DE, Sluka KA, Brennan TJ, Lewin GR, Welsh MJ. The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron*. 2001; 32: 1071-1083.
- Proske U. The Golgi tendon organ, *Int Rev Physiol*. 1981; 25:127-171.
- Proske U. The mammalian muscle spindle. *News Physiol Sci*. 1997; 12: 37-42.

- Proske U. Exercise, fatigue and proprioception: a retrospective. *Exp Brain Res.* 2019; 237: 2447-2459.
- Proske U. The role of muscle proprioceptors in human limb position sense: a hypothesis. *J Anat.* 2015; 227:178-183.
- Proske U, Gandevia SC. The kinaesthetic senses. *J Physiol.* 2009; 587: 4139-4146.
- Proske U, Gandevia SC. The proprioceptive senses: their roles in signaling body shape, body position and movement, and muscle force. *Physiol Rev.* 2012; 92:1651-1697.
- Proske U, Gandevia SC. Kinesthetic Senses. *Compr Physiol.* 2018; 8: 1157-1183.
- Qi L, Iskols M, Handler A, Ginty DD. Krause corpuscles of the genitalia are vibrotactile sensors required for normal sexual behavior. *bioRxiv.* 2023; <https://doi.org/10.1101/2023.06.14.545006>
- 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; 516:121-125.
- Ribeiro F, Oliveira J. Aging effects on joint proprioception: the role of physical activity in proprioception preservation. *Eur Rev Aging Phys Act.* 2007; 4: 71-76.
- Ridone P, Vassalli M, Martinac B. Piezo1 mechanosensitive channels: what are they and why are they important. *Biophys Rev.* 2019; 11: 795-805.
- Roh J, Hwang SM, Lee SH, Lee K, Kim YH, Park CK. Functional Expression of Piezo1 in Dorsal Root Ganglion (DRG) Neurons. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 3834.
- Sachs F. Mechanical transduction by ion channels: A cautionary tale. *World J Neurol.* 2015; 5: 74-87.
- Saotome K, Murthy SE, Kefauver JM, Whitwam T, Patapoutian A, Ward AB. Structure of the mechanically activated ion channel Piezo1. *Nature.* 2017; 554: 481.
- Savadipour A, Palmer D, Ely EV, Collins KH, Garcia-Castorena JM, Harissa Z, Kim YS, Oestrich A, Qu F, Rashidi N, Guilak F. The role of PIEZO ion channels in the musculoskeletal system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2023; 324: C728-C740.
- Schneider ER, Mastrotto M, Laursen WJ, Schulz VP, Goodman JB, Funk OH, Gallagher PG, Gracheva EO, Bagriantsev SN. Neuronal mechanism for acute mechanosensitivity in tactile-foraging waterfowl. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111: 14941-14946.
- Sharma N, Flaherty K, Lezgiyeva K, Wagner DE, Klein AM, Ginty DD. 2020. The emergence of transcriptional identity in somatosensory neurons. *Nature* 2020; 577:392-398.

- Shin SM, Itson-Zoske B, Fan F, Gani U, Rahman M, Hogan QH, Yu H. Peripheral sensory neurons and non-neuronal cells express functional Piezo1 channels. *Mol Pain*. 2023; 19, 17448069231174315.
- Shin SM, Moehring F, Itson-Zoske B, Fan F, Stucky CL, Hogan QH, Yu H. Piezo2 mechanosensitive ion channel is located to sensory neurons and nonneuronal cells in rat peripheral sensory pathway: implications in pain. *Pain*. 2021; 162: 2750-2768.
- Simon A, Shenton F, Hunter I, Banks RW, Bewick GS. Amiloride-sensitive channels are a major contributor to mechanotransduction in mammalian muscle spindles, *J Physiol*. 2010; 588: 171-85.
- Soattin L, Fiore M, Gavazzo P, Viti F, Facci P, Raiteri R, Difato F, Pusch M, Vassalli M. The biophysics of piezo1 and piezo2 mechanosensitive channels. *Biophys Chem*. 2016; 208:26-33.
- Soukup T, Pederosa-Domellöf F, Thornell LE: Intrafusal fiber type composition of muscle spindles in the first human lumbrical muscle, *Acta Neuropathol (Berl)*. 2003; 105:18-24.
- Suazo I, Vega JA, García-Mesa Y, García-Piqueras J, García-Suárez O, Cobo T. The Lamellar Cells of Vertebrate Meissner and Pacinian Corpuscles: Development, Characterization, and Functions. *Front Neurosci*. 2022;16: 790130.
- Suchyna TM, Sachs F. Mechanosensitive channel properties and membrane mechanics in mouse dystrophic myotubes. *J Physiol*. 2007; 581:369-87.
- Swash M, Fox KP. The effect of age on human skeletal muscle. Studies of the morphology and innervation of muscle spindles. *J Neurol Sci*. 1972; 16: 417-432.
- Szczot M, Liljencrantz J, Ghitani N, Barik A, Lam R, Thompson JH, Bharucha-Goebel D, Saade D, Necaie A, Donkervoort S, Foley AR, Gordon T, Case L, Bushnell MC, Bönnemann CG, Chesler AT. PIEZO2 mediates injury-induced tactile pain in mice and humans. *Sci Transl Med*. 2018; 10(462):eaat9892.
- Szczot M, Nickolls AR, Lam RM, Chesler AT. The Form and Function of PIEZO2. *Annu Rev Biochem*. 2021; 90: 507-534.
- Szczot M, Pogorzala LA, Solinski HJ, Young L, Yee P, Le Pichon CE, Chesler AT, Hoon MA. Cell-Type-Specific Splicing of Piezo2 Regulates Mechanotransduction. *Cell Rep*. 2017; 21: 2760-2771.
- 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.
- Thornell LE, Carlsson L, Eriksson PO, Liu JX, Österlund C, Stål P, Pedrosa-Domellöf F. Fibre typing of intrafusal fibres. *J Anat*. 2015; 227: 136-156.

- Umans BD, Liberles SD. 2018. Neural sensing of organ volume. *Trends Neurosci.* 2198; 41:911–924.
- Vega JA. Propioceptores articulares y musculares. *Biomechanica* 1999; 13: 79-93.
- Vega JA, Cobo J. Structural and cellular basis for proprioception. En: *Proprioception*, J.A. Vega y J. Cobo Eds. InTech Open, pp. 1-18, 2021.
- Verma D, Ye N, Meng F, Sachs F, Rahimzadeh J, Hua SZ. Interplay between cytoskeletal stresses and cell adaptation under chronic flow. *PLoS One.* 2012; 7: e44167.
- Verschueren SM, Brumagne S, Swinnen SP, Cordo PJ. The effect of aging on dynamic position sense at the ankle. *Behav Brain Res.* 2002; 136: 593-603.
- Villarino NW, Hamed YMF, Ghosh B, Dubin AE, Lewis AH, Odem MA, Loud MC, Wang Y, Servin-Vences MR, Patapoutian A, Marshall KL. Labeling PIEZO2 activity in the peripheral nervous system. *Neuron.* 2023; 111: 2488-2501.
- von Buchholtz LJ, Lam RM, Emrick JJ, Chesler AT, Ryba NJ. 2020. Assigning transcriptomic class in the trigeminal ganglion using multiplex in situ hybridization and machine learning. *Pain* 2020; 161:2212–2224.
- Wang F, Knutson K, Alcaïno C, Linden DR, Gibbons SJ, Kashyap P, Grover M, Oeckler R, Gottlieb PA, Li HJ, Leiter AB, Farrugia G, Beyder A. Mechanosensitive ion channel Piezo2 is important for enterochromaffin cell response to mechanical forces. *J Physiol.* 2017; 595:79-91.
- Wang L, Zhou H, Zhang M, Liu W, Deng T, Zhao Q, Li Y, Lei J, Li X, Xiao B. Structure and mechanogating of the mammalian tactile channel PIEZO2. *Nature* 2019; 573: 225-229.
- Wilkinson KA. Molecular determinants of mechanosensation in the muscle spindle. *Curr Opin Neurobiol.* 2022; 74:102542.
- Williams SR, Chapman CE. Time course and magnitude of movement-related gating of tactile detection in humans. II. Effects of stimulus intensity. *J Neurophysiol.* 2000; 84: 863-875.
- Woo SH, Lukacs V, de Nooij JC, Zaytseva D, Criddle CR, Francisco A, Jessell TM, Wilkinson KA, Patapoutian. Piezo2 is the principal mechanotransduction channel for proprioception. *Nat Neurosci.* 2015; 18: 1756-1762.
- Woo SH, Ranade S, Weyer AD, Dubin AE, Baba Y, Qiu Z, Petrus M, Miyamoto T, Reddy S, Lumpkin EA, Stucky CL, Patapoutian A. Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction. *Nature.* 2014; 509:622-626.
- 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.
- Wu H, Petitpré C, Fontanet P, Sharma A, Bellardita C, Quadros RM, Jannig PR, Wang Y, Heimel JA, Cheung KKY, Wanderoy S, Xuan Y, Meletis K, Ruas J, Gurumurthy CB, Kiehn

- O, Hadjab S, Lallemand F. Distinct subtypes of proprioceptive dorsal root ganglion neurons regulate adaptive proprioception in mice. *Nat Commun.* 2021; 12(1): 1026.
- Yamanishi H, Iwabuchi T. 2023. Three-dimensional correlative light and focused ion beam scanning electron microscopy reveals the distribution and ultrastructure of lanceolate nerve endings surrounding terminal hair follicles in human scalp skin. *J Anat.* 2023; 242: 1012-1028.
- Zeng WZ, Marshall KL, Min S, Daou I, Chapleau MW, Abboud FM, Liberles SD, Patapoutian A. PIEZOs mediate neuronal sensing of blood pressure and the baroreceptor reflex. *Science.* 2018; 362: 464-467.
- Zhao Q, Wu K1, Geng J, Chi S, Wang Y, Zhi P, Zhang M, Xiao B. Ion permeation and mechanotransduction mechanisms of mechanosensitive piezo channels. *Neuron.* 2016; 89:1248-1263.
- 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.
- Zheng Y, Liu P, Bai L, Trimmer JS, Bean BP, Ginty DD. Deep sequencing of somatosensory neurons reveals molecular determinants of intrinsic physiological properties. *Neuron* 2019; 103:598–616.e7
- Zimmerman A, Bai L, Ginty DD. The gentle touch receptors of mammalian skin. *Science.* 2014; 346: 950-954.

9. Anexo 1 – c.v.

Se presenta en documento aparte

10. Anexo 2 – Publicación derivada de la tesis

Manuscrito aceptado para publicación como capítulo del libro “ANATOMY OF THE PROPRIOCEPTION”, editado por P. de Girolamo – IntechOpen

Book Chapter Template

Structural and biological basis for proprioception

José A. Vega and Simón Ordoñez

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

Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Chile, Santiago de Chile, Chile
javega@uniovi.es

Abstract

The proprioception is the sense of positioning and movement. It is mediated by proprioceptors, a small subset of mechanosensory neurons localized in the dorsal root ganglia that convey information about the stretch and tension of muscles, tendons, and joints. These neurons supply afferent innervation to specialized sensory organs in muscles (muscle spindles) and tendons (Golgi tendon organs). Thereafter, the information originated in the proprioceptors travels throughout two main nerve pathways reaching the central nervous system at the level of the spinal cord and the cerebellum (unconscious) and the cerebral cortex (conscious) for processing. On the other hand, since the stimuli for proprioceptors are mechanical (stretch, tension) proprioception can be regarded as a modality of mechanosensitivity and the putative mechanotransducers proprioceptors begins to be known now. The mechanogated ion channels acid-sensing ion channel 2 (ASIC2), transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) and PIEZO2 are among candidates. Impairment or poor proprioception is proper of ageing and some neurological diseases. Future research should focus on treating these defects. This chapter intends provide a comprehensive update an overview of the anatomical, structural and molecular basis of proprioception as well as of the main causes of proprioception impairment, including ageing, and possible treatments.

Keywords: proprioception, muscle spindles, mechanotransduction, ion channels, proprioceptive pathways, spinocerebellar tracts

1. Introduction

Proprioception is a wider sense, that include position and movement of parts of the body relative to one another, and the force and effort associated with muscle contraction and movement. But properly the term *proprioception* applies for the sensory information contributing to sense of self position, whereas *kinesthesia* refers of sense of movement. The first one is regarded as an automatic function and unconscious in contrast with the second one considered as conscious. In the words of Kröger and Watkins [1] “*Proprioceptive information informs us about the contractile state and movement of muscles, about muscle force, heaviness, stiffness, viscosity and effort and, thus, is required for any coordinated movement, normal gait and for the maintenance of a stable posture*”. This information travels to the central nervous system, but differently to other components of somatosensitivity, a great part of the proprioceptive sense does not reach consciousness. This is probably due to suppression as a consequence of the motor signals [2] or

inhibitions along somatosensory pathways [3]. The precise knowledge of the pathways of proprioception, especially those of conscious proprioception, are of capital interest to better understand this sense. The techniques of neuroimaging are providing new insights about the cerebral process of proprioception.

Proprioception originates by the activation of proprioceptors at the periphery. Proprioceptors are a subset of mechanosensory neurons that provide afferent innervation to specialized sensory organs located inside the muscles and tendons, but probably also in joint capsules and ligaments, and the skin. According to Proske and Gandevia [4,5] the sense of “*proprioception is achieved through a summation of peripheral sensory input describing the degree of, and changes in, muscle length and tension, joint angle, and stretch of skin*”. In fact, the proper definition of proprioception coined by Sherrington in 1906 (“*In muscular receptivity we see the body itself acting as a stimulus to its own receptors—the proprioceptors*”) suggest that the body contains different kinds of proprioceptors. Here we have focused on muscle spindles and Golgi’s tendon organs. Especial interest was done on the mechanisms of mechanotransduction and the ion channel in this process.

Proprioception is impaired in some physiological and pathological situations. It will gain interest in the coming years due to the ageing of population: the deficit of proprioception is associated with the increased frequency of falls in the elderly [6-8]. Furthermore, several diseases, especially some neurodegenerative disorders, course with proprioception deficits [9,10] which treatment require a better knowledge of the molecular aspects of proprioception and new active research.

This chapter is aimed not to perform a Review on all the different aspects of proprioception but just to review some general and recent advances in proprioception. We intend to provide the readers of this book with an up-to-date appraisal of the structural and biological basis of proprioception. There are excellent reviews on the topic [4,5,11,12] and we forward the interested to them. Robert W. Banks' extraordinary paper (2015) [13] masterfully sums up the history of knowledge of muscle spindles. Likewise, the recent reviews Kröger [14] Kröger and Watkins [1] are mandatory.

2. Proprioceptors

The peripheral receptors of proprioception are located in tissues around the joints, including skin, muscles, tendons, fascia, joint capsules, and ligaments [15] which contains different morphotypes of mechanoreceptors [16]. It is currently believed that proprioception is not generated by a single receptor, but by multiple of receptors. In any case proprioception has been related with sensory receptors localized in the muscles while kinesthesia has been more associated with joint and cutaneous receptors [17-19]. Nevertheless, the historically regarded as true proprioceptors are muscle spindles and Golgi’s tendon organs.

The *joints mechanoreceptors* are Ruffini-like and Pacinian corpuscles which signal joint movement but not movement direction or joint position [15]. Regarding *cutaneous receptors* four kinds of mechanoreceptors are present in glabrous skin (Meissner’s corpuscles, Pacinian corpuscles, Ruffini corpuscles and Merkel cell-neurite complexes) [20,21,22]. A definitive role of cutaneous mechanoreceptors as proprioceptors has not been definitively established [23-25] although it is possible a convergence between cutaneous and muscle afferents at the spinal cord and thalamic levels.

But independently of the modest contribution of cutaneous and articular mechanoreceptors to proprioception, the main stretch-sensitive receptors are muscle spindles found in most, but not all, skeletal muscles. For instance, they are absent from most cephalic muscles [26,27]. Interestingly, muscle spindles are more abundant in muscles in which the precision of movements must be accurate. On the other hand, the main tension-sensitive receptors are the Golgi's tendon organs, located at the ends of muscle fibers [28,29]. These two sensory organs respond to changes in mechanical conditions, namely in muscle length (muscle spindles) or in actively generated force (Golgi-tendon organs) but both are contraction receptors.

2.1. Muscle spindles

Vertebrate muscle spindles are complex sensory organs that have both sensory and motor innervation. Each muscle spindle receives at least one sensory fiber that innervate specialized muscle fibers denominated intrafusal fibers. These intrafusal fibers also receive motor innervation by γ -motoneurons [30,31]. Structurally, they are encapsulated mechanoreceptors, and functionally are slowly adapting-loth threshold mechanoreceptors [5].

Muscle spindles are highly variable in number from none in most cephalic muscles (see [27]) to numerous in lumbrical or deep neck muscles [32,33]. These differences are attributed functional muscular demands of muscles but the number of muscle spindles per motor unit is rather equal [34]. Also, no topographical differences in muscle spindles between mono- and multiarticular muscles were noted [35].

Within the connective capsule that delimits each muscle spindles there are the intrafusal fibers and the periaxial space filled with a fluid. Three zones can be differentiated at the muscle spindle: the central or equatorial zone, the juxta-equatorial zone, and the terminal or polar zone; small segments of the intrafusal fibres can be found outside the poles of the muscle (Fig. 1).

The intrafusal muscle fibers. Banks and co-workers [36] established that mammalian muscle spindles regularly contain three types of intrafusal muscle fibers. Based on their morphology and the arrangement of nuclei in the equatorial zone they fall into two main categories: nuclear bag fibers and nuclear chain fibers. Bag and chain fibers differs in structure, histochemical profile (myosin type, ATPase activity [37,38,39]) and functional properties. Bag fibers are greater in diameter and length than chain fibers, extend outside of the capsule, and they can be subdivided into bag1 and bag2 types (see for a review [40]). Human contains on average 8-20 intrafusal fibers and can lack bag1 or bag2 fibers [37].

As mentioned previously, muscle spindles are stretch detectors, i.e. “*they sense how much and how fast a muscle is lengthened or shortened*” [41]. Accordingly, when a muscle is stretched this change in length is transmitted to the intrafusal fibers which are in turn stretched. And to respond appropriately intrafusal fibers are double innervated by afferent sensory neurons and efferent motoneurons.

Sensory innervation. “*Just as the number of sensory endings varies from spindle to spindle, even within a single muscle, so also does the number of motor axons supplying those spindles*” [13].

There are two types of afferents that innervate intrafusal fibers: primary (type Ia) and secondary (type II) endings which differ in their axonal conduction velocity [13].

Each muscle spindle receives only one **Ia afferent** surrounding like a dock the equatorial zone of all the intrafusal fibers (spirals or annulospiral endings) (Fig. 1). When spiral endings deform detect changes in length of the muscle. Primary afferents are sensitive to dynamic stretch, have irregular spontaneous or volitionally maintained discharge, and exhibit an off-response at the point of relaxation (i.e., muscle stretch) followed by a slow ramping isometric contraction; they are off during rapid voluntary contraction [13].

The number **type II afferent** endings in a muscle spindle varies from zero to five, and they supply one intrafusal fiber terminating mainly on nuclear chain fibers. The endings of the

secondary afferents are spirals ending on the polar ends of the intrafusal fibers (Fig. 1). Secondary afferents have a regular tonic discharge, and do not exhibit an off-response at the termination of a voluntary ramp-and-hold contraction [42,43].

Motor innervation. In addition to sensory neurons, intrafusal muscle fibers are also innervated by efferent motoneurons (fusimotor innervation). Axons of motoneurons enter the muscle spindle together with the sensory fibers and innervate intrafusal fibers in the polar regions forming motor endplates.

Motor innervation originates from myelinated **γ -motoneurons** (diameter 4–8 μm), also known as fusimotor motoneurons. They have been differentiated into static and dynamic. Dynamic axons have a weak effect on primary afferent firing while the static ones have a great influence on both primary and secondary afferents (see [43]).

Occasionally additional afferent innervation of muscle spindles originates from axons that also supply extrafusal muscle, known as **β -motoneurons** or skeleto-fusimotor fibers. These fibers supply both intrafusal and extrafusal fibers via motor endplates at the polar ends. The endplates of γ -motoneurons differ structurally from those formed by α -motoneurons on extrafusal fibers, but both are cholinergic synapses with many features in common, including junctional folds and a basal lamina filling the synaptic cleft. [42-46].

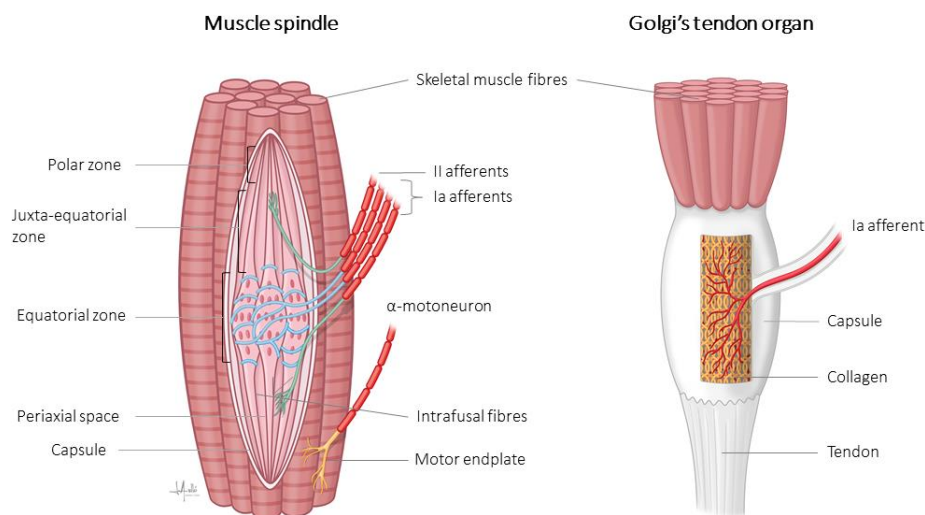


Figure 1.- Schematic representation of a muscle spindle and a Golgi's tendon organ. Muscle spindles are capsulated mechanoreceptors that consist of intrafusal muscle fibers (bag1, bag2 and chain), a periaxial space filled with a fluid, and a connective capsule. They are supplied by Ia (blue) and II (green) afferents. Golgi's tendon organs are capsulated mechanoreceptors that consist of collagen fibers and type Ia afferents (red).

Stimulation of γ -motoneurons result in excitation of both Ia and II muscle spindle afferents. On the other hand, stimulation of **α -motoneurons** supplying extrafusal muscle fibers, results in coactivation of γ -motoneurons which in turn causes the contraction of the polar ends of the intrafusal fibers, restoring tension and sensitivity of the muscle spindle to stretch.

Thus, the γ -motoneuron function control the sensitivity of muscle spindle afferents as length detectors. Therefore, the muscle spindle's function as a length sensor arises essentially from its anatomical relationship with its parent muscle. Any length change in the parent muscle result in stretch of intrafusal fibers that is then detected by sensory receptors located on the equatorial and polar regions of the muscle spindle [44].

2.2. Golgi's tendon organ (tendon spindle)

The Golgi-tendon organ or tendon-spindle, localized at the origins and insertion of tendon, or rarely within the tendon. It is a mechanoreceptor that informs on muscle tension via its Ib afferent (Fig. 1).

Structurally it consists of a capsule and within it there are loosely packed collagen fibers and muscle fibers (3-50). Among these elements there is a unique Ia afferent which branches to innervate the distal and the proximal parts of the organ [28,47]. With respect to the skeletal muscle fibers the Golgi-tendon organ is in series between muscle and tendon.

FISIOLOGIA The Golgi-tendon model react to “static and dynamic responses to activation of single motor units whose muscle fibers insert into the Golgi tendon organ, self and cross adaptation, non-linear summation when multiple motor units are active in the muscle, and the proportional relationship between the cross-adaptation and summation recorded for various pairs of motor units” [47,48].

3. Mechanotransduction in muscle spindles

The sensory terminals of muscle spindles appear to adhere to the surface of the intrafusal muscle fibers, and although they possess a basal lamina in close contact with the plasmalemma it is absent at the sensory terminals.

3.1. Afferent glutamate-ergic neurotransmission in muscle spindles?

Bewick and co-workers [44] have demonstrate the occurrence of a complete glutamatergic neurotransmission system in the afferents of muscle spindles associated to the synaptic-like vesicles typical of those terminals. Exogenous glutamate enhances spindle excitability, an effect that can be pharmacologically blocked with specific molecules. On the other hand, synaptic-like vesicles contain glutamate, which is released during membrane cycling and, subsequently, a requirement for a replenishment mechanism.

This observation, however, does not exclude the possibility that other neuroactive substances also occur in these sensory terminals.

3.2. Ion channels and mechanotransduction in muscle spindles

In addition to the possible classical neurotransmission, the primary mechanism of mechanical transduction in muscle spindle sensory endings is the activation of stretch-sensitive ion channels. In mechanotransduction, i.e. the conversion of mechanical stimuli into biological or electrical signal, is triggered by members of the superfamilies of degenerin-epithelial Na⁺-channels (Deg/ENa⁺C; including acid-sensing ion channels -ASIC-), transient receptor potential channels (TRP), two-pore domain potassium (K_{2p}), and PIEZO [49,50]. Some of them have been detected directly in proprioceptors as well as in primary sensory neurons innervating them. However, and similarly as in cutaneous mechanoreceptors, the stretch-sensitive channels responsible for transducing mechanical stimuli in spindle afferents awaits definitive identification (see [51]).

There is mounting evidence for the involvement of members of the Deg/ENa⁺C superfamily as mechanosensory channel(s) in mammalian primary afferent neurons, and in the sensory endings of muscle spindles [52-54]. All four subunits of the ENaC channel (α , β , γ and δ) are present in spindle primary-sensory terminals [44,54].

ASICs are members are a family of voltage-insensitive cation channels expressed in the nervous system and many types non-nervous cells. In rodents and humans six ASIC subtypes (ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3, and ASIC4) have been identified and their expression patterns are now rather well known [55,56]. Regarding muscle spindles, evidence has been obtained in favour of a role of ASIC2 as primary mechanotransducer [53,54]. Consistently, mice deficient in ASIC2, and also in ASIC3, show deficits in mechanical sensitivity [57-59].

PIEZO are Ca²⁺-permeable mechanosensitive channels characterized by their large size and structure [60-62]. Piezo2 is expressed in proprioceptive dorsal root ganglia (DRG) neurons [63,64] as well as sensory endings of proprioceptors innervating muscle spindles and Golgi tendon organs in mice [64]. Loss of Piezo2 in proprioceptive neurons results in ataxia and dysmetria, severely uncoordinated body movements and abnormal limb positions, contracture of multiple joints, and muscle weakness, suggesting that PIEZO2 requirement for the activity of

these mechanosensors [64-69]. Recently, an elegant study by the Ana Gomis's group corroborated these findings using mesencephalic nucleus proprioceptive neurons [70].

Regarding TRP channels there is little evidence for a role in low-threshold sensation in spindles.

5. Proprioceptive pathways

To drive proprioception to the central nervous system two different pathways must be considered: the unconscious proprioception is conveyed primarily via the spinocerebellar tracts to the cerebellum while the conscious proprioception is conveyed by the dorsal column-medial lemniscus pathway and the thalamus to the cerebral cortex.

Classically, the proprioceptive pathways of the spinal nerves have been described as a 2 neurons chain. The primer order neuron is a pseudo-unipolar neuron whose bodies are localized in DRG whose peripheral axonal branches reach proprioceptors (especially muscle spindles and Golgi tendon organs) and the central branch reach the base of the dorsal horn of the spinal cord. The second order neurons are placed in the medial Stilling-Clarke's column (which extends between the medullary segments C8 and L2) and the lateral Bechterew's column, both corresponding to the Rexed's lamina VII of the dorsal horn; in these columns the spinocerebellar tracts (dorsal or Foville-Flechsig fascicle and ventral or Gowers fascicle) originate to ascend and reach the cerebellum. This information is necessary unconscious. The spinocerebellar neurons together provide the major direct sensory projection from the hindlimbs and lower part of the trunk to the cerebellum. A parallel system serving the forelimbs includes the direct cuneocerebellar and rostral spinocerebellar tracts and other indirect pathways via the lateral reticular nucleus and the inferior olive.

Nevertheless, some aspects of the proprioception are conscious, and therefore the information must reach the cerebral cortex. For these components of the proprioceptive sensitivity, the proprioceptive pathways consist of a 3 neurons chain. The primary order neurons are placed in DRG and the central branch of their axons ascend throughout the dorsal columns of the spinal cord to reach the gracile and cuneate nuclei in the medulla. In those nuclei are placed the bodies of the secondary order neurons whose axons project to the ventral postero-lateral (VPL) nucleus of the thalamus (tertiary order neuron) whose axons end in the somatosensory cortex to provide the conscious perception of proprioception.

A particular question arises from cephalic muscles. They are innervated by cranial nerves and most of them (with the exception of jaw muscles and extraocular muscles) lack typical proprioceptors, i.e. muscle spindles. At present is commonly accepted that the proprioception of the cephalic territory depends on the trigeminal nerve [27,71]. But the Gasser's ganglion of the trigeminal nerve does not contain proprioceptive neurons, while they are localized in the trigeminal mesencephalic nucleus.

5.1. Primary order neurons: the proprioceptive neurons

The proprioceptive neurons represent a small population (about 7-10%) of DRG primary sensory neurons and correspond with those with the largest cell bodies [72]. They can be classified and distinguished from other dorsal root ganglion neurons as a unique neuronal population using single cell transcriptome analysis [73]. They typically express the neurotrophin receptor TrkC (the preferred ligand for neurotrophin-3) and the Ca²⁺-binding protein parvalbumin [74], as well as other markers that define this neuronal population [75].

The peripheral branch of the axons of the proprioceptive pseudo-unipolar neurons forms large-myelinated A α and A β fibers in peripheral nerves, while the central branch establish synapse in the spinal cord or ascends throughout the dorsal columns of the spinal cord to reach the gracile and cuneate nuclei in the medulla. Some peripheral branches, however, travel through the cuneatus tract and ascend the cervical spinal cord to reach the medulla oblongata to reach the accessory cuneate nucleus.

5.2. Secondary order neurons: the medial Stilling-Clarke's (*nucleus dorsalis*) and lateral Bechterew's columns

The secondary order neurons of the proprioceptive pathways are localized at the base of the dorsal horn of the spinal cord, in correspondence with the VII Rexed's lamina, also known as the intermediate zone of the spinal cord. In this place two nuclear columns were classically considered: the nucleus dorsalis of Clarke (also known as Clarke's column, dorsal nucleus, posterior thoracic nucleus) and the medial nucleus (also known as Bechterew's nucleus). The axons of the neurons localized at these places form the spinocerebellar tracts.

5.3. The Spinocerebellar Tracts – Unconscious proprioception

The tracts that carry unconscious proprioceptive information are collectively known as the spinocerebellar tracts. Within the spinocerebellar tracts, there are four individual pathways: ventral, dorsal, rostral and cuneocerebellar.

5.3.1. *Ventral spinocerebellar tract* (VSCT; anterior spinocerebellar, Gowers' fascicle). VSCT originates mainly from the medial part of lamina 7 in the lumbosacral segments, from the dorsolateral nucleus of lamina 9 at L3-L6, and also from the neurons of the ventrolateral nucleus of lamina 9 and the lateral part of lamina 7 at L4-L5 segments [76,77]. Axons decussate in the anterior white commissure and run in the ventral border of the lateral funiculi. They ascend through the brainstem to the pons where turn dorsally and enter the cerebellum throughout the superior cerebellar peduncle. For the most part, the ventral spinocerebellar tract axons recross the midline in the deep white matter of the cerebellum to terminate ipsilaterally. It terminates in the cortex of the anterior lobe and vermis of the posterior lobe and give collaterals to the globose and [emboliform nuclei](#).

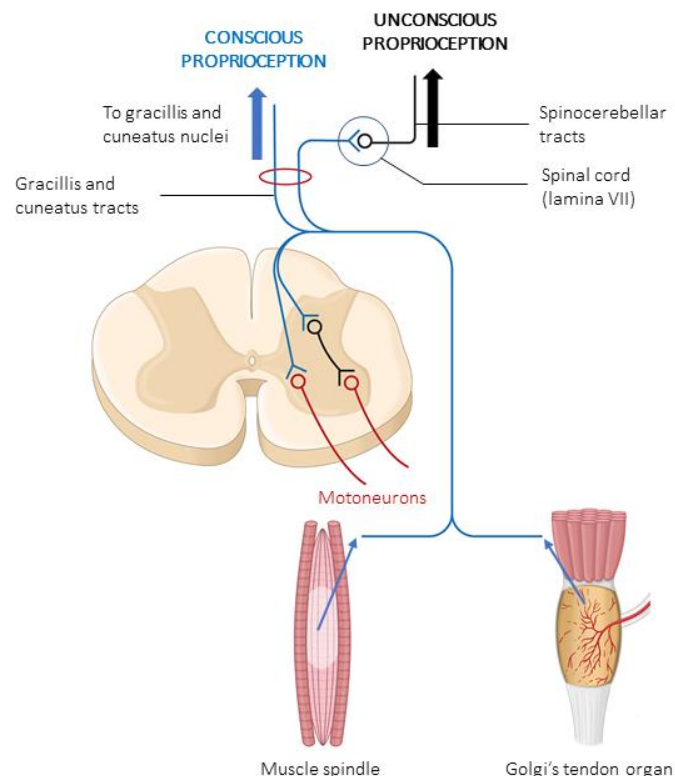


Figure 2.- Schematic representation of proprioceptive unconscious (black) and conscious (blue) pathways reaching the cerebellum and the brain, respectively.

5.3.2. *Dorsal spinocerebellar tract* (DSCT; posterior spinocerebellar tract, Flechsig's fasciculus, Foville-Flechsig fasciculus). This nucleus is present from Th1 through the second lumbar spinal

segments and is largest in the lower thoracic and upper lumbar segments [77]. The cells of origin of the DSCT are classically described as residing in Clarke's column of the lumbar and thoracic spinal cord segments. The *nucleus dorsalis* of Clarke is a group of neurons localized in the medial part of lamina VII extending from C7 to L2 levels related to the proprioception of the lower limb. Caudally it begins at L2 level and reaches its maximum at Th12 level and above Th8 level its size diminishes, and the column ends at C7 level. Nevertheless, it is represented in other spinal regions by scattered neurons, which become aggregated to form a cervical nucleus at C3 level and a sacral nucleus in the middle of the sacral spine region.

In addition, other groups of neurons that also belong to DSCT are located throughout the intermediate and dorsal laminae of the thoracic and lumbosacral segments of the spinal cord. The axons of the DSCT ascend ipsilaterally in the peripheral region of the funiculus lateralis of the spinal cord. Then, they continue to course through the [medulla oblongata](#) and finally pass through the [inferior cerebellar peduncle](#) and into the [cerebellum](#), and terminate in the cerebellar cortex of lobules I–V, in the anterior lobe and in the posterior lobe vermis and paramedian lobe. In addition to those cortical projections, there is evidence that DSCT fibers also terminate in the medial and interpositus cerebellar nuclei.

5.3.3. *Rostral spinocerebellar tract*. The rostral spinocerebellar tract appears to be the upper extremity homolog of the [ventral spinocerebellar tract](#). The neurons of origin of this tract are located in Rexed laminae V-VII of the C5-C8 segments. The projection is predominantly ipsilateral, but there is also a minor bilateral projection. The axons of the rostral spinocerebellar tract neurons terminate in the anterior and paramedian lobule cerebellar.

5.3.4. *Cuneocerebellar tract* (posterior external arcuate fibers, dorsal external arcuate fibers). DSCT does not convey information from the upper limb since the *nucleus dorsalis* does not extend into the cervical spinal cord. Therefore, there is another proprioceptive pathway for the upper limb: the cuneocerebellar tract. The secondary order neurons of this nucleus pass to the [inferior ipsilateral cerebellar peduncle](#) to reach the spinocerebellum.

5.3.5. *Other spinocerebellar tracts*. There are additional ascending direct and indirect spinocerebellar pathways. The *spinocervical tract* relays in the lateral cervical nucleus and projects to the ventral postero-lateral (VPL) nucleus of the thalamus. The *spinohypothalamic* and *spinoamygdalar* tract provides sensory input to areas of the nervous system involved in controlling autonomic, endocrine and emotional responses. Sensory information from the hindlimbs is also relayed by indirect *spinoreticulocerebellar* pathways through at least two olivocerebellar pathways: the indirect *spinoreticuloolivocerebellar* tract and the direct *spinoolivocerebellar* tract.

These pathways provide necessary information regarding the current status of reflex pathways, as well as muscle tone, length and tension that consent the cerebellum to coordinate and regulate motor activity.

5.4. The brain connection – Conscious proprioception

According to Proske and Gádivia [4] there are at least two reasons for including body schemas and images in the study and discussion of proprioception. “*First, while proprioceptors provide information about position and movement of the limb, they are unable to signal the length of limb segments and therefore the absolute location of the limb in space. Second, there is the issue of body ownership*”. The blind movement of a limb, while proprioceptive feedback informs us about the movement, we need to be able to identify the moving limb as our own [78,79]. Carruthers has proposed that all representations of the body are available to consciousness [80]. “On-line,” newly constructed body representations, provided by inputs from vision, touch, and proprioception, generate a perception of the body as it actually is at any moment in time, an image which is able to change from moment to moment. It is distinguished from an “off-line” representation constructed, in part, from current sensory inputs, in part, from stored memories and is available to consciousness both immediately and after retrieval of memories.

In the last times neuroimaging has strongly contributed to the knowledge of the central activity patterns produced by proprioceptive stimuli, to the recognition of the integration of proprioceptive inputs with inputs from other senses and the identification of central areas involved in the integration [81]. These include regions in the parietal cortex [82-85] including the primary somatosensory cortex [86,87]. Furthermore, parts of the frontal cortex and insula [88,89] are involved in proprioception.

5.5. The mesencephalic trigeminal nucleus

The mesencephalic trigeminal nucleus is a sensory structure located at the mesopontine junction and contains the cell bodies of primary order afferent proprioceptors that innervate muscle spindles of the muscles of mastication and other muscles of the head and neck (Lazarow, 2000). Whether these primary sensory neurons are generated directly in brain or have a [neural crest](#) origin is still debated. Classically it has been regarded as a representation of a peripheral sensory ganglion similar to DRG that became incorporated into the brainstem during embryonic development, although molecular studies support a central origin for these cells. (Müller F1, O'Rahilly R, 2011; Dyer et al., 2014).

It projects to the dorsolateral division of the trigeminal motor nucleus and to the supratrigeminal nucleus, which are involved in humans in the jaw-jerk reflex and the periodontal-masseteric reflex [92] (for a review see [93]).

6. Proprioception from a clinical perspective: Causes for impaired proprioception

Proprioception is a critical factor for stability, and it is well known it deteriorates in aged people [94]. In fact, the proprioceptive system undergoes significant structural and functional changes with ageing which cause a progressive decline in somatosensibility including proprioception [95-97].

Ageing courses with muscle weakness from sarcopenia, decrease in the number of intrafusal fibers in muscle spindles, and denervation. All together these facts diminished muscle force and consistently the proprioception which, in turn determine the increase in falls in the elderly with clinical and public health consequences. The specific relationship between muscle strength and proprioception should be explored further as it may provide a basis for the claim that exercise improves standing stability. Interestingly, to achieve a reduction in the incidence of falls, it is not sufficient to improve muscle strength alone as exercises are required which actually challenge standing stability. These changes might contribute to the frequent falls and motor control problems observed in older adults. On the structural level, muscle spindles in aged humans possess fewer intrafusal fibers, an increased capsular thickness and some spindles which show signs of denervation [98,99].

A variety of neurological diseases are characterized by irregular, jerky movement or posture due to loss of proprioceptive sensory feedback, a disturbance called afferent ataxia. The affected neurons are primary sensory neurons in the dorsal root ganglia relaying body position and movement (proprioception) to the central nervous system. Proprioception dysfunction can be caused by injuries and disorders that affect any part of the proprioceptive system between the sensory receptors that send the signals to the parts of the brain that receive and interpret them. The risk of proprioception loss increases as we age due to a combination of natural age-related changes to the nerves, joints, and muscles. Examples of injuries and conditions that can cause proprioceptive deficit include: brain injuries, herniated disc, arthritis, multiple sclerosis (MS), stroke, autism spectrum disorder (ASD), diabetes, peripheral neuropathy, Parkinson's disease, Huntington's disease, ALS (amyotrophic lateral sclerosis), or Lou Gehrig's disease. Joint injuries, such as an ankle sprain or knee sprain, joint replacement surgery, such as hip replacement or knee replacement, Parkinson's disease. Primary proprioceptive neurons may be the target of hereditary, developmental, degenerative, toxic, inflammatory and autoimmune pathology. Accordingly, typical clinical consequences of pathology affecting proprioceptive

neurons, in addition to afferent ataxia, include loss of deep tendon (stretch) reflexes and of conscious perception of position and movement of body parts, often associated with loss of perception of vibration [9]. Recently, Dionisi and co-workers have obtained proprioceptive primary sensory neurons from iPSCs, and the generation of intrafusal fibers in vitro are opening new perspectives for the treatment of some ataxia linked to altered primary proprioceptive neurons [100,1001].

References

- [1] [Kröger S](#), [Watkins B](#). Muscle spindle function in healthy and diseased muscle. *Skelet Muscle*. 2021; 11:3.
- [2] Williams SR, Chapman CE. Time course and magnitude of movement-related gating of tactile detection in humans. II. Effects of stimulus intensity. *J Neurophysiol*. 2000; 84: 863-875.
- [3] Ciancia F, Maitte M, Coquery JM. Reduction during movement of the evoked potentials recorded along the extralemniscal pathways of the cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1980; 48: 197-202.
- [4] Proske U, Gandevia SC. The kinaesthetic senses. *J Physiol*. 2009; 587: 4139-4146.
- [5] [Proske U](#), [Gandevia SC](#). The proprioceptive senses: their roles in signaling body shape, body position and movement, and muscle force. *Physiol Rev*. 2012; 92:1651-1697.
- [6] [Ferlinc A](#), [Fabiani E](#), [Velnar T](#), [Gradisnik L](#). The Importance and Role of Proprioception in the Elderly: a Short Review. *Mater Sociomed*. 2019; 31: 219-221.
- [7] [Henry M](#), [Baudry S](#). Age-related changes in leg proprioception: implications for postural control. *J Neurophysiol*. 2019; 122: 525-538.
- [8] [Ganz DA](#), [Latham NK](#). Prevention of Falls in Community-Dwelling Older Adults. *N Engl J Med*. 2020; 382: 734-743.
- [9] Pandolfo M, Manto M. Cerebellar and Afferent Ataxias. *Continuum Lifelong Learn Neurology* 2013; 19: 1343.
- [10] [Klockgether T](#), [Mariotti C](#), [Paulson HL](#). Spinocerebellar ataxia. *Nat Rev Dis Primers*. 2019; 5: 24.
- [11] [Proske U](#), [Gandevia SC](#). Kinesthetic Senses. *Compr Physiol*. 2018; 8: 1157-1183.
- [12] [Proske U](#). Exercise, fatigue and proprioception: a retrospective. *Exp Brain Res*. 2019; 237: 2447-2459.
- [13] Banks RW. The innervation of the muscle spindle: a personal history. *J Anat*. 2015; 227: 115-135.
- [14] Kröger S. Proprioception 2.0: novel functions for muscle spindles. *Curr Opin Neurol*. 2018; 31:592-598.
- [15] Grigg P. Peripheral neural mechanisms in proprioception. *J Sport Rehab*. 1994; 3: 2-17.
- [16] [Banks RW](#), [Hulliger M](#), [Saed HH](#), [Stacey MJ](#). A comparative analysis of the encapsulated end-organs of mammalian skeletal muscles and of their sensory nerve endings. *J Anat*. 2009; 214: 859-887.
- [17] Burke D, Gandevia SC, Macefield G. Responses to passive movement of receptors in joint, skin and muscle of the human hand. *J Physiol*. 1988; 402: 347-361.
- [18] Collins DF, Prochazka A. Movement illusions evoked by ensemble cutaneous input from the dorsum of the human hand. *J Physiol*. 1996; 496: 857-871.
- [19] Frith C. The self in action: lessons from delusions of control. *Consciousness Cognition*. 2005; 14: 752-770.
- [20] Johansson RS, Flanagan JR. Coding and use of tactile signals from the fingertips in object manipulation tasks. *Nat Rev Neurosci*. 2009; 10: 345-359.
- [21] Zimmerman A, Bai L, Ginty DD. The gentle touch receptors of mammalian skin. *Science*. 2014; 346: 950-954.
- [22] [Cobo R](#), [García-Piqueras J](#), [Cobo J](#), [Vega JA](#). The Human Cutaneous Sensory Corpuscles: An Update. *J Clin Med*. 2021; 10(2). pii: E227.
- [23] Gandevia SC, Miller S, Aniss AM, Burke D. Reflex influences on muscle spindle activity in relaxed human leg muscles. *J Neurophysiol*. 1986; 56: 159 -170.
- [24] Edin BB. Quantitative analyses of dynamic strain sensitivity in human skin mechanoreceptors. *J Neurophysiol*. 2004; 92: 3233-3243.
- [25] Izumizaki M, Tsuge M, Akai L, Proske U, Homma I. The illusion of changed position and movement from vibrating one arm is altered by vision or movement of the other arm. *J Physiol*. 2010; 588: 2789-2800.

- [26] Cobo JL, Abbate F, de Vicente JC, Cobo J, Vega JA. Searching for proprioceptors in human facial muscles. *Neurosci Lett.* 2017; 640:1-5.
- [27] Cobo JL, Solé-Magdalena A, Junquera S, Cobo T, Vega JA, Cobo J. The Proprioception in the Muscles Supplied by the Facial Nerve. In: *Selected Topics in Facial Nerve Disorders*, I. Al-Zwaini and M.J Hussein Eds. InTechOpen, London, 2019, pp. 15.28.
- [28] Jami L. Golgi tendon organs in mammalian skeletal muscle: functional properties and central actions. *Physiol Rev.* 1992; 72: 623-666.
- [29] Proske U. The tendon organ. In: *Peripheral Neuropathy*, edited by Dyck P, Thomas P, Griffin J, Low P, Poduslo J. Philadelphia, PA: Saunders, 1993, p. 141-148.
- [30] Banks RW. The muscle spindle. In: Dyck PJ, Thomas PK, editors. *Peripheral neuropathy*. 4. Philadelphia: WB Saunders; 2005. pp. 131–150.
- [31] [Banks RW](#). The innervation of the muscle spindle: a personal history. *J Anat.* 2015; 227:115-135.
- [32] Soukup T, Pederosa-Domellöf F, Thornell LE: Intrafusal fiber type composition of muscle spindles in the first human lumbrical muscle, *Acta Neuropathol (Berl)*. 2003; 105:18-24.
- [33] Kulkarni V, Chandy MJ, Babu KS: Quantitative study of muscle spindles in suboccipital muscles of human fetuses. *Neurol India.* 2001; 49: 355-359.
- [34] Liu J-X, Eriksson PO, Thornell L-E, Pedrosa-Domellof F. Myosin heavy chain composition of muscle spindles in human biceps brachii, *J Histochem Cytochem.* 2002; 50:171-184.
- [35] Liu J-X, Eriksson PO, Thornell L-E, Pedrosa-Domellof F. Fiber content and myosin heavy chain composition of muscle spindles in aged human biceps brachii. *J Histochem Cytochem.* 2005; 53: 445-454.
- [36] Banks RW, Harker DW, Stacey MJ. A study of mammalian intrafusal muscle fibres using a combined histochemical and ultrastructural technique. *J Anat.* 1977; 123: 783-796.
- [37] Liu J-X, Thornell L-E, Pedrosa-Domellof F. Muscle spindles in the deep muscles of the human neck: a morphological and immunocytochemical study. *J Histochem Cytochem.* 2003; 51: 175-186.
- [38] Ovalle WK, Smith RS: Histochemical identification of three types of intrafusal muscle fibers in cat and monkey based on myosin ATPase reaction *Can J Physiol Pharmacol.* 1972; 50:195-202.
- [39] Kucera J, Dorovini-Zis K. Types of human intrafusal muscle fibers. *Muscle Nerve.* 1979; 2:437-451.
- [40] Thornell LE, Carlsson L, Eriksson PO, Liu JX, Österlund C, Stål P, Pedrosa-Domellöf F. Fibre typing of intrafusal fibres. *J Anat.* 2015; 227: 136 -156.
- [41] Matthews PB. Where Anatomy led, Physiology followed: a survey of our developing understanding of the muscle spindle, what it does and how it works. *J Anat.* 2015;227: 104-114.
- [42] Edin BB, Vallbo AB. Dynamic response of human muscle spindle afferents to stretch. *J Neurophysiol.* 1990a; 63: 1297-1306.
- [43] Proske U. The mammalian muscle spindle. *News Physiol Sci.* 1997; 12: 37-42.
- [44] Bewick GS, Banks RW. Mechanotransduction in the muscle spindle. *Pflugers Arch.* 2015; 467:175-90.
- [45] Banks RW. The motor innervation of mammalian muscle-spindles. *Prog Neurobiol.* 1994;43: 323-362.
- [46] Manuel M, Zytnicki D. Alpha, beta and gamma motoneurons: functional diversity in the motor system's final pathway. *J Integr Neurosci.* 2011; 10: 243-276.
- [47] Proske U. The Golgi tendon organ, *Int Rev Physiol.* 1981; 25:127-171.
- [48] Mileusnic MP, Loeb GE. Mathematical models of proprioceptors. II Structure and function of the Golgi tendon organ, *J Neurophysiol.* 2006; 96:1789-1802.
- [49] Delmas P, Coste B. Mechano-gated ion channels in sensory systems. *Cell.* 2013; 155:278-284.
- [50] [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(17). pii: E6221.

- [51] Anderson EO, Schneider ER, Bagriantsev SN. Piezo2 in Cutaneous and Proprioceptive Mechanotransduction in Vertebrates. *Curr Top Membr.* 2017; 79: 197-217.
- [52] Ismailov II, Berdiev BK, Shlyonsky VG, Benos DJ. Mechanosensitivity of an epithelial Na⁺ channel in planar lipid bilayers: release from Ca²⁺ block. *Biophys J.* 1997; 72:1182-1192.
- [53] Simon A, Shenton F, Hunter I, Banks RW, Bewick GS. Amiloride-sensitive channels are a major contributor to mechanotransduction in mammalian muscle spindles, *J Physiol.* 2010; 588: 171-85.
- [54] Althaus M, Bogdan R, Clauss WG, Fronius M. Mechano-sensitivity of epithelial sodium channels (ENaCs): laminar shear stress increases ion channel open probability. *FASEB J.* 2007; 21:2389–2399.
- [55] Baron A, Lingueglia E. Pharmacology of acid-sensing ion channels - physiological and therapeutical perspectives. *Neuropharmacology.* 2015; 94:19-35. Cheng YR, BY, Chen CC. Acid-sensing ion channels: dual function proteins for chemo-sensing and mechano-sensing. *J Biomed Sci.* 2018; 25: 46.
- [56] Lee CH, Chen CC. Roles of ASICs in Nociception and Proprioception. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1099: 37-47.
- [57] [Chen CC](#), [Wong CW](#). Neurosensory mechanotransduction through acid-sensing ion channels. *J Cell Mol Med.* 2013 ;17: 337-49.
- [58] Lin SH, Sun WH, Chen CC. Genetic exploration of the role of acid-sensing ion channels. *Neuropharmacology.* 2015; 94: 99-118.
- [59] Omerbasic D, Schuhmacher LN, Bernal Sierra YA, Smith ES, Lewin GR. ASICs and mammalian mechanoreceptor function. *Neuropharmacology.* 2015; 94:80-86.
- [60] [Murthy SE](#), [Dubin AE](#), [Patapoutian A](#). Piezos thrive under pressure: mechanically activated ion channels in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017; 18:771-83.
- [61] Saotome K, Murthy SE, Kefauver JM, Whitwam T, Patapoutian A, Ward AB. Structure of the mechanically activated ion channel Piezo1. *Nature.* 2017; 554: 481.
- [62] [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.
- [63] [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; 18:1756-1862.
- [64] Woo SH, Ranade S, Weyer AD, Dubin AE, Baba Y Qiu Z, Petrus M, Miyamoto T, Reddy K, Lumpkin EA, Stucky CL, Patapoutian A. Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction. *Nature.* 2014; 509:622-6.
- [65] Chesler AT, Szczot M, Bharucha-Goebel D, Čeko M, Donkervoort S, Laubacher C, Hayes LH, Alter K, Zampieri C, Stanley C, Innes AM, Mah JK, Grosmann CM, Bradley N, Nguyen D, Foley AR, Le Pichon CE, Bönnemann CG. The role of *PIEZO2* in human mechanosensation. *N Engl J Med.* 2016; 375: 1355-64.
- [66] Haliloglu G, Becker K, Temucin C, Talim B, Küçükşahin N, Pergande M, Motameny S, Nürnberg P, Aydingoz U, Topaloglu H, Cirak S. Recessive *PIEZO2* stop mutation causes distal arthrogryposis with distal muscle weakness, scoliosis and proprioception defects. *J Hum Genet.* 2017; 62:597-501.
- [67] Delle Vedove A, Storbeck M, Heller R, Hölker I, Hebbbar M, Shukla A, Magnusson O, Cirak S, Girisha KM, O'Driscoll M, Loeys B, Wirth B. Biallelic loss of proprioception-related *PIEZO2* causes muscular atrophy with perinatal respiratory distress, arthrogryposis, and scoliosis. *Am J Hum Genet.* 2016; 99:1206-16.
- [68] Mahmud AA, Nahid NA, Nassif C, Sayeed MS, Ahmed MU, Parveen M, Khalil MI, Islam MM, Nahar, Z, Rypens F, Hamdan FF, Rouleau GA, Hasnat A, Michaud JL. Loss of the proprioception and touch sensation channel *PIEZO2* in siblings with a progressive form of contractures. *Clin Genet.* 2017; 91:470-5.

- [69] Assaraf E, Blecher R, Heinemann-Yerushalmi L, Krief S, Carmel Vinestock R, Biton IE, Brumfeld V, Rotkopf R, Avisar E, Agar G, Zelzer E. Piezo2 expressed in proprioceptive neurons is essential for skeletal integrity. *Nat Commun.* 2020; 11: 3168.
- [70] [Florez-Paz D](#), [Bali KK](#), [Kuner R](#), [Gomis A](#). A critical role for Piezo2 channels in the mechanotransduction of mouse proprioceptive neurons. *Sci Rep.* 2016; 6:25923.
- [71] Lazarov NE. Neurobiology of orofacial proprioception. *Brain Research Reviews.* 2007; 56:362-383.
- [72] Marmigère F, Ernfors P. Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. *Nat Rev Neurosci.* 2007; 8: 114-127.
- [73] Oliver KM, Florez-Paz DM, Badea TC, Mentis GZ, Menon V, de Nooij JC. Molecular development of muscle spindle and Golgi tendon organ sensory afferents revealed by single proprioceptor transcriptome analysis. *bioRxiv.* 2020. DOI: 10.1101/2020.04.03.023986.
- [74] Hippenmeyer S. [Vrieseling E](#), [Sigrist M](#), [Portmann T](#), [Laengle C](#), [Ladle DR](#), [Arber S](#).. A Developmental Switch in the Response of DRG Neurons to ETS Transcription Factor Signaling. *Plos Biol.* 2005; 3: e159.
- [75] Poliak S, Norovich AL, Yamagata M, Sanes JR, Jessell TM. Muscle-type Identity of Proprioceptors Specified by Spatially Restricted Signals from Limb Mesenchyme. *Cell* 2016; 164: 512-525.
- [76] [Xu Q](#), [Grant G](#). Course of spinocerebellar axons in the ventral and lateral funiculi of the spinal cord with projections to the posterior cerebellar termination area: an experimental anatomical study in the cat, using a retrograde tracing technique. *Exp Brain Res.* 2005; 162:250-256.
- [77] Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G (Eds). *The spinal cord*. Academic Press, New York, 2008.
- [78] De Vignemont F. Body schema and body image—pros and cons. *Neuropsychologia* 2010; 48: 669-680.
- [79] Longo MR, Haggard P. An implicit body representation underlying human position sense. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107: 11727-11732.
- [80] Carruthers G. Types of body representation and the sense of embodiment. *Conscious Cogn.* 2008; 17: 1302-1316.
- [81] Sanchez-Vives MV, Slater M. From presence to consciousness through virtual reality. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6: 332-339.
- [82] Ehrsson HH, Holmes NP, Passingham RE. Touching a rubber hand: feeling of body ownership is associated with activity in multisensory brain areas. *J Neurosci*, 2005; 25: 10564-10573.
- [83] Ehrsson HH, Spence C, Passingham RE. That's my hand! Activity in premotor cortex reflects feeling of ownership of a limb. *Science* 2004; 305: 875-877.
- [84] Pellijeff A, Bonilha L, Morgan PS, McKenzie K, Jackson SR. Parietal updating of limb posture: an event-related fMRI study. *Neuropsychologia.* 2006; 44: 2685-2690.
- [85] Hagura N, Oouchida Y, Aramaki Y, Okada T, Matsumura M, Sadato N, Naito E. Visuokinesthetic perception of hand movement is mediated by cerebro-cerebellar interaction between the left cerebellum and right parietal cortex. *Cereb Cortex.* 2009; 19: 176-186.
- [86] Schaefer M, Flor H, Heinze HJ, Rotte M. Morphing the body: illusory feeling of an elongated arm affects somatosensory homunculus. *Neuroimage.* 2007; 36: 700-705.
- [87] Schaefer M, Heinze HJ, Rotte M. My third arm: shifts in topography of the somatosensory homunculus predict feeling of an artificial supernumerary arm. *Hum Brain Mapp.* 2009; 30: 1413-1420.
- [88] Schwoebel J, Coslett HB. Evidence for multiple, distinct representations of the human body. *J Cogn Neurosci.* 2005; 17: 543-553.
- [89] Tsakiris M, Hesse MD, Boy C, Haggard P, Fink GR. Neural signatures of body ownership: a sensory network for bodily self-consciousness. *Cereb Cortex.* 2007; 17: 2235-2244.
- [90] [Dyer C](#), [Linker C](#), [Graham A](#), [Knight R](#). Specification of sensory neurons occurs through diverse developmental programs functioning in the brain and spinal cord. *Dev Dyn.* 2014; 243: 1429-1439.

- [91] [Müller F](#), [O'Rahilly R](#). The initial appearance of the cranial nerves and related neuronal migration in staged human embryos. *Cells Tissues Organs*. 2011; 193: 215-238.
- [92] Shigenaga Y, Yoshida A, Mitsuhiro Y, Doe K, Suemune S. Morphology of single mesencephalic trigeminal neurons innervating periodontal ligament of the cat. *Brain Res*. 1988; 448: 331-338.
- [93] [Yoshida A](#), [Moritani M](#), [Nagase Y](#), [Bae YC](#). Projection and synaptic connectivity of trigeminal mesencephalic nucleus neurons controlling jaw reflexes. *J Oral Sci*. 2017; 59: 177-182.
- [94] Ribeiro F, Oliveira J. Aging effects on joint proprioception: the role of physical activity in proprioception preservation. *Eur Rev Aging Phys Act*. 2007; 4: 71-76.
- [95] Verschueren SM, Brumagne S, Swinnen SP, Cordo PJ. The effect of aging on dynamic position sense at the ankle. *Behav Brain Res*. 2002; 136: 593-603.
- [96] Landelle C, El Ahmadi A, Kavounoudias A. Age-related impairment of hand movement perception based on muscle proprioception and touch. *Neuroscience*. 2018; 381:91-104.
- [97] [García-Piqueras J](#), [García-Mesa Y](#), [Cárcaba L](#), [Feito J](#), [Torres-Parejo I](#), [Martín-Biedma B](#), [Cobo J](#), [García-Suárez O](#), [Vega JA](#). Ageing of the somatosensory system at the periphery: age-related changes in cutaneous mechanoreceptors. *J Anat*. 2019; 234:839-852.
- [98] Swash M, Fox KP. The effect of age on human skeletal muscle. Studies of the morphology and innervation of muscle spindles. *J Neurol Sci*. 1972; 16: 417-432.
- [99] Liu JX, Eriksson PO, Thornell LE, Pedrosa-Domellof F. Fiber content and myosin heavy chain composition of muscle spindles in aged human biceps brachii. *J Histochem Cytochem*. 2005; 53: 445-454.
- [100] Dionisi C, Rai M, Chazalon M, Schiffmann SN, Pandolfo M. Primary proprioceptive neurons from human induced pluripotent stem cells: a cell model for afferent ataxias. *Sci Rep*. 2020; 10: 7752.
- [101] Barret P, Quick TJ, Mudera V, Player DJ. Generating intrafusal skeletal muscle fibres in vitro: Current state of the art and future challenges. *J Tissue Eng*. 2020; 11: 1-15.