

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA**

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO ANATÓMICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DE
LOS GANGLIOS ASOCIADOS A LOS NERVIOS
LARINGEOS HUMANOS**

Marta Eva Ibáñez Escribano
Barcelona, 2003

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS**

**ESTUDIO ANATÓMICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS
GANGLIOS ASOCIADOS A LOS NERVIOS LARINGEOS
HUMANOS**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR
MARTA EVA IBAÑEZ ESCRIBANO
MÉDICO ESPECIALISTA EN O.R.L.

BARCELONA, JUNIO DE 2003

A mi marido Josep

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Dr. D. Jose-Ramón Sañudo Tejero, director de esta tesis, por su paciencia, perseverancia y tutela sin las cuales no habría podido acabar este proyecto y cuyo quehacer diario me ha supuesto un estímulo para continuar trabajando.

Al servicio de ORL del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau que en todo momento ha colaborado facilitando la obtención de las muestras que han sido necesarias para la realización de la presente tesis y de manera muy especial al Dr. D. Miquel Quer i Agustí, tutor de la misma, por la ayuda y colaboración ofrecidas.

Al departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UAB y de manera especial al Dr. D. Enrique Verdú por la ayuda prestada en el desarrollo de las técnicas de inmunoquímica.

A mis compañeros del departamento de ciencias de morfológicas de la Facultad de Medicina de la UAB de manera especial a Miguel Hurtado por su importante colaboración a esta tesis y a Eva Maranillo por su ayuda y apoyo.

INDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 8 |
| 1.1. Paragangliomas laríngeos..... | 10 |
| 1.2. Generalidades sobre los paraganglios. | |
| 1.2.1. Evolución histórica del concepto de paraganglio..... | 12 |
| 1.2.2. Distribución de los paraganglios..... | 16 |
| 1.3. Paraganglios laríngeos. | |
| 1.3.1. Localización de los paraganglios laríngeos..... | 19 |
| 1.3.2. Estructura de los paraganglios laríngeos..... | 24 |
| 1.3.3. Función de los paraganglios laríngeos..... | 28 |
| 1.3.4. Inervación de los paraganglios laríngeos..... | 32 |
| 1.3.5. Péptidos reguladores implicados en la inervación de los paraganglios laríngeos..... | 35 |
| 1.4. Ganglios autónomos laríngeos..... | 44 |
| 1.4.1. Naturaleza de los ganglios laríngeos..... | 45 |
| 1.4.2. Función de los ganglios laríngeos..... | 48 |
| 1.4.3. Número y localización de los ganglios laríngeos en el humano y diferentes especies..... | 50 |
| 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS | 57 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODO | 60 |
| 3.1. Microscopia óptica..... | 61 |
| 3.1.1 Fijación de las laringes..... | 61 |
| 3.1.2 Obtención de las muestras..... | 62 |
| 3.1.3 Procesamiento de las muestras..... | 63 |
| 3.1.4 Proceso de tinción del nervio..... | 65 |
| 3.2. Inmunohistoquímica..... | 67 |
| 3.2.1 Obtención y número de la muestra quirúrgica..... | 68 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 3.2.2 | Procesamiento de la muestra..... | 71 |
| 3.3.3 | Técnica de inmunohistoquímica..... | 72 |
| 3.3.4 | Técnicas de inmunoperoxidasa..... | 75 |
| 4. | RESULTADOS..... | 96 |
| 4.1. | Distribución del Nervio laringeo interno..... | 97 |
| 4.1.1 | Ganglios: número y localización..... | 100 |
| 4.2. | Distribución del Nervio recurrente..... | 105 |
| 4.2.1 | Ganglios: número y localización..... | 107 |
| 4.3. | Naturaleza inmunohistoquímica de los ganglios/paraganglios | |
| 4.3.1 | Ganglio/paraganglio asociado a la rama A 1..... | 111 |
| - | Cromogranina A | 111 |
| - | Tiroxina Hidroxilasa..... | 113 |
| - | Acetilcolina transferasa | 114 |
| - | VIP..... | 115 |
| - | NP-Y..... | 116 |
| - | SP..... | 118 |
| - | CGRP..... | 118 |
| 4.3.2 | Ganglio/paraganglio asociado a la rama anterior del nervio recurrente..... | 121 |
| - | Cromogranina A | 121 |
| - | Tiroxina Hidroxilasa..... | 122 |
| - | Acetilcolina transferasa | 123 |
| - | VIP..... | 124 |
| - | NP-Y..... | 125 |
| - | SP..... | 126 |
| - | CGRP..... | 127 |
| 5. | DISCUSIÓN..... | 131 |
| 5.1. | Comentarios sobre la metodología..... | 132 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 5.2. | Número y localización de los ganglios y/o paraganglios..... | 135 |
| 5.3. | Tamaño de los ganglios..... | 141 |
| 5.4. | Estructura: estudio a microscopia óptica..... | 142 |
| 5.5. | Estudio inmunohistoquímico sobre la naturaleza de los ganglios. | |
| 5.5.1 | Cromogranina A. | 145 |
| 5.5.2 | Neurotransmisores: | 147 |
| | - Tiroxina Hidroxilasa. | |
| | - Acetilcolina transferasa. | |
| 5.5.3 | Neuromoduladores: neuropéptidos..... | 151 |
| | - VIP | |
| | - NP-Y | |
| | - SP | |
| | - CGRP | |
| 6. | CONCLUSIONES | 158 |
| 7. | BIBLIOGRAFIA | 162 |

1. INTRODUCCIÓN

*"Toda ciencia es entre otras cosas,
un ordenar, un simplificar,
un hacer digerible lo que el espíritu no puede digerir."*

Hermann Hesse

1. INTRODUCCIÓN

Los tumores neuroendocrinos representan una de las patologías menos habituales en la laringe (Googe y col., 1988; Salim y col., 1993). Estos tumores neuroendocrinos constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias cuyo diagnóstico anatomopatológico preciso es básico para dictaminar la modalidad terapéutica adecuada (Googe y col., 1988; Martínez-Madrigal y col., 1991).

Existen dos diferentes teorías sobre el origen de los tumores neuroendocrinos de la laringe. La que considera que se originan de las células argirófilas neuroendocrinas distribuidas por la laringe que formarían parte del llamado sistema APUD o sistema neuroendocrino difuso (Perrin y col., 1978; Hohbach y Mootz, 1978; Justrabo y col., 1980; Pesce y col., 1984) y la que postula que se formarían a partir de células no argirófilas, multipotenciales, con capacidad de diferenciación neuroendocrina, hecho que vendría a justificar la mezcla de diferenciación escamosa, glandular exocrina y neuroendocrina que presentan la mayoría de este tipo de tumores (Wasserman y Savargaonkar, 2001).

Los tumores neuroendocrinos de la laringe se han dividido en dos grupos: epitelial o grupo I, y neuronal o grupo II (Peterson y col., 1997; Wick, 2000). El grupo I, incluye todos los carcinomas neuroendocrinos y se subdivide a su vez en grado 1 (carcinoide clásico), grado 2 (carcinoide atípico) y grado 3 (carcinoma de células pequeñas y carcinoma neuroendocrino de células grandes). Los tumores del grupo II, incluye los denominados paragangliomas laríngeos.

1.1.PARAGANGLIOMAS LARÍNGEOS

Los primeros casos de paragangliomas laríngeos, también llamados tumores glómicos o quemodectomas, aparecen descritos en 1955 (Andrews, 1955; Blanchard y Saunders, 1955; Zeitlhofer, 1955). Inicialmente se les consideró derivados de tejidos o masas glómicas aberrantes o ectópicas (Lawson y Zack, 1974). Sin embargo, desde las descripciones realizadas por Watzka (1963) y Kleinssasser (1964) de dos pares de estructuras paraganglionares asociadas a los nervios laríngeos superior y recurrente, llamadas paraganglio laríngeo superior e inferior respectivamente, se acepta que son estructuras asociadas a dichos nervios laríngeos.

Los paragangliomas laríngeos superiores se han descrito en diversas localizaciones: pliegue aritenoepiglótico, el pliegue ventricular y pliegue vocal (Glenner y Grimley, 1974; Lawson y Zack, 1974; Piquet y col., 1976; Hohbach y Mootz, 1978; Perrin y col., 1978; Justrabo y col., 1980; Wetmore y col., 1981; Sneige y col. 1983). Los paragangliomas, desarrollados a partir del paraganglio inferior, se han descrito localizados por debajo de las cuerdas vocales con una menor incidencia que los superiores (Martinson y col 1967; Glenner y Grimley, 1974; Perrin y col. 1978; Justrabo y col., 1980; Peterson y col., 1997). En algunos casos se les ha descrito en contacto con la glándula tiroidea (Lawson y Zack, 1974). De aquí, que algunos autores consideren que los paragangliomas tiroideos son tumores también derivados del paraganglio laríngeo inferior (Brownlee y Shockley, 1992).

Los tumores paraganglionares han sido descritos con muy diversa terminología en función de la evolución histórica que ha sufrido el conocimiento sobre la histogénesis de estos tumores (Lachard y col., 1984).

El término de tumores glómicos obedeció a las similitudes histológicas halladas entre las nuevas estructuras que se iban descubriendo y el cuerpo o glomus carotídeo. Hemos de tener presente que el concepto de glomus carotídeo es un vestigio de la antigua y errónea idea sobre el origen vascular del cuerpo carotídeo (Glenner y Grimley, 1974). Este término puede llevar a una confusión con las estructuras neuro-mio-vasculares descritas por Masson (1924) en la piel (glomérulos cutáneos) y otras localizaciones (glomus coccígeo) y con sus correspondientes tumores (tumores glómicos o glomangiomas).

Otro término utilizado, el de quemodectoma, también fue aplicado a la laringe, pero no tuvo una gran difusión. Fue propuesto inicialmente por Mulligan (1950) y, posteriormente retomado por Kjaergaard (1973) para hacer referencia a la actividad quimiorreceptora de los cuerpos carotídeos y aórticos. Pero estas dos estructuras, son los únicos paraganglios conocidos del cuerpo humano que se comportan como quimiorreceptores. Por tanto, se puede considerar que el término quemodectoma es una denominación inapropiada para asignar a todos los paraganglios.

En la actualidad el término más aceptado es el de paraganglioma laríngeo (superior o inferior) que se definen como tumores de origen neuroectodérmico, bien diferenciados, que se caracterizan por tener una rica vascularización.

1.2. GENERALIDADES SOBRE LOS PARAGANGLIOS

1.2.1. Evolución histórica del Concepto de Paraganglio

El término paraganglio, fue acuñado en 1903 por Khon. Con dicho término, en la actualidad, se hace referencia a grupos de células derivadas de la cresta neural, con reacción cromafín, situadas fuera de la glándula suprarrenal y distribuidas ampliamente dentro y a lo largo del sistema nervioso autónomo (Dyson, 1995).

Los paraganglios se subdividieron en estructuras cromafines o no cromafines en función de la presencia o ausencia de la llamada reacción cromafín (Khon 1903). Esta reacción consiste en la oxidación de las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) al reaccionar con las sales de cromo. Esta reacción fue inicialmente descrita, de manera exclusiva, en la médula adrenal (Henle, 1841,1865; Werner, 1857) pero más tarde esta reacción se pudo también observar en células aisladas o en grupos celulares presentes dentro o cerca de los ganglios y fascículos nerviosos (Böck, 1982).

Por tanto, en función de la reacción cromafín, los paraganglios se clasificaron en, cromafines y no cromafines. A los paraganglios cromafines se les relacionó con el sistema simpático y con capacidad de síntesis y de almacenamiento de catecolaminas. A los paraganglios no cromafines se les relacionó con el sistema parasimpático, y por tanto implicados en el metabolismo de la acetilcolina (Watza, 1943).

Sin embargo, el desarrollo de técnicas mucho más sensibles que la reacción cromafín permitió demostrar que todos los paraganglios producían catecolaminas y en algunos casos indolaminas además de otros múltiples marcadores neuroendocrinos (Böck, 1982; Dyson 1995).

Hoy, por tanto, se emplea el término de *paraganglio* no sólo para referirse a la estructura formada por células en las que se puede demostrar o no la clásica reacción cromafín, sino a la formada por células que cumplen los siguientes criterios morfológicos e histoquímicos (Böck, 1982):

1. Demostración morfológica a nivel ultraestructural de organelas subcelulares capaces de almacenar catecolaminas o indolaminas, para lo cual no es necesario la presencia de iones de cromo.
2. Localización a nivel ultraestructural de precipitados de catecolaminas o indolaminas obtenidas mediante la fijación con glutaraldehído.
3. Identificación de catecolaminas o indolaminas mediante la microscopia de fluorescencia de alta sensibilidad.
4. Demostración mediante técnicas de inmunohistoquímica de las enzimas involucradas en la síntesis de las aminas biógenas en cuestión.

A las células paraganglionares también se las ha considerado incluidas en otros sistemas o clasificaciones: sistema APUD (Pearse, 1966, 1969) o paraneuronal (Fujita, 1976).

El concepto de sistema APUD fue introducido por Pearse (1966, 1969) para incluir en él a un numeroso grupo de células que tenían unas características histoquímicas comunes, de las cuales la principal y constante era la que daba el nombre al sistema, es decir, la capacidad de captar y descarboxilar aminas (**A**mine **P**recursor **U**ptake and **D**escarboxilation). Inicialmente se sugirió que

todas las células APUD derivaban de células ectoblásticas de la cresta neuronal, pero hoy en día se tiene constancia de que pueden tener su origen en cualquiera de las tres hojas embrionarias (ectodermo, mesodermo o endodermo). Todas estas células, sin embargo, pueden ser agrupadas dentro del sistema neuroendocrino difuso que se describió como una versión actualizada del sistema APUD (Pearse, 1984). Las células consideradas en el sistema neuroendocrino difuso secretan neurotransmisores y neuromoduladores y tienen receptores de superficie celular muy similares (Myssiorek, 2001). Este sistema incluye sobre unos 40 tipos diferentes de células entre las que se encuentra las células cromafines mencionadas anteriormente, las células fluorescentes de pequeña intensidad (*small intensely fluorescent cells*, SIF), las células del hipotálamo productoras de péptidos, las células endocrinas de las glándulas hipofisaria, pineal y parótida, las células de Kulchitsky en el pulmón, las células mioendocrinas del atrio y ventrículo cardiaco, las células gastroenteropancreáticas, las células adrenomedulares etc.

Paralelamente a la descripción del sistema APUD o neuroendocrino difuso aparece la de paraneurona. El término de paraneurona fue creado por Fujita (1976) para definir a unas células receptosecretoras que tenían las siguientes propiedades:

1. Capacidad para sintetizar supuestas sustancias neurotransmisoras.
2. Capacidad de síntesis de proteínas y/o péptidos de identificada o supuesta actividad hormonal.
3. Capacidad para acumular sustancias dentro de vesículas subcelulares (vesículas de tipo sináptico, vesículas densas, gránulos de neurosecreción).

4. Función neurosecretora, esto es, células que secretan sus productos en respuesta a estímulos específicos.

5. Origen neuroectodérmico. Este último punto fue posteriormente abandonado por el propio Fujita (Fujita y Kobayashi, 1979).

Existe un amplio grupo de células que forman parte de este sistema de paraneuronas: células de la médula adrenal, interneuronas adrenérgicas, células paraganglionares del cuerpo carotídeo, células parafoliculares del tiroides, células principales paratiroides, células adenohipofisarias, mastocitos, melanocitos, células de Merkel de la piel, pinealocitos, células de los islotes pancreáticos, células endocrinas gastroentéricas, bronquiales, uretrales y prostáticas, células gustativas, células ciliadas del sistema vestibulo-coclear y células fotorreceptoras de la retina (Böck, 1982).

Por tanto, como resumen podríamos considerar que al igual que las células paraganglionares del cuerpo carotídeo, las células de los paraganglios laringeos reúnen las características para poder ser consideradas también pertenecientes al sistema neuroendocrino difuso dentro del concepto de paraneuronas.

1.2.2. Distribución de los paraganglios

Aunque los paraganglios no se diferencien morfológicamente entre si la clásica subdivisión en simpáticos y parasimpáticos se sigue manteniendo en la actualidad obedeciendo exclusivamente a razones topográficas (Tischler, 1997).

Los paraganglios simpáticos, cuyo principal representante es la médula adrenal, se encuentran principalmente localizados en dos regiones, en los ganglios de las cadenas simpáticas para y prevertebrales, y en el tejido conectivo adyacente a las estructuras pélvicas. Los situados en los ganglios simpáticos pueden encontrarse dentro o adyacentes a los mismos. En la literatura estas células paraganglionares se han descrito con muy diversos términos: células fluorescentes de pequeña intensidad (small intensely fluorescent, SIF), células intraganglionares cromafines, o células que contienen pequeños gránulos (small granule containing, SGC).

El término de SIF fue propuesto por Eränkö y Härkönen (1963,1965) quienes a través de la fluorescencia inducida por el formaldehído describieron células intensamente fluorescentes aisladas o bien en pequeños grupos dentro de los ganglios simpáticos cervicales superiores. El término de SGC procede de la gran abundancia en vesículas electrodensas que estas células tienen cuando se las observa a microscopia electrónica (Matthews y Raisman, 1969).

El segundo grupo de paraganglios simpáticos se localiza a lo largo de las fibras del plexo hipogástrico inferior en relación con los órganos urogenitales, especialmente en la vejiga urinaria y a lo largo del plexo sacro. No tienen normalmente nombre propio y su número y localizaciones son bastante variables. Una excepción a lo mencionado es la médula adrenal y del órgano

de Zuckerkandl. Este último órgano es el único paraganglio simpático extra-adrenal visible macroscópicamente localizado en relación con la arteria mesentérica inferior (Zuckerkandl, 1901).

Los paraganglios parasimpáticos están distribuidos a lo largo de las ramas craneales y torácicas de los nervios glossofaríngeo y vago. Algunos autores han clasificado a estos paraganglios como “branquioméricos” para hacer hincapié en su origen a partir del arco branquial o faríngeo correspondiente (Glenner y Crimley, 1974). Los principales paraganglios asociados al nervio glossofaríngeo son: el paraganglio timpánico, situado en la pared del oído medio y el cuerpo carotídeo que deriva del tercer arco faríngeo (Guild, 1953; Glenner y Crimley, 1974; Zak y Lawson, 1983). Los del nervio vago incluyen el paraganglio yugular, situado en el suelo del oído medio (Guild, 1953; Glenner y Crimley, 1974; Zak y Lawson, 1983); los paraganglios laríngeos superiores e inferiores, derivados del cuarto y sexto arco faríngeo respectivamente (Glenner y Crimley, 1974; Zak y Lawson, 1983; Dahlqvist, 1986 d), los paraganglios subclavios, derivados del cuarto arco y los paraganglios aórtico-pulmonares que derivan del cuarto y sexto arco faríngeos (Glenner y Crimley, 1974).

También se han descrito paraganglios “intravagales” localizados dentro, o adyacentes, al tronco principal del vago, o en la vecindad o cerca de sus ganglios nodoso y yugular (Zak y Lawson, 1983; Grillo y col., 1974). Estos ganglios vagales son los únicos ganglios sensitivos conocidos que contienen células neuroendocrinas comparables a las células SIF descritas en los ganglios simpáticos (Grillo y col., 1974). Estos últimos paraganglios no están incluidos dentro de los paraganglios “branquioméricos” a pesar de tener características histológicas, ultraestructurales o citoinmohistoquímicas iguales

a ellos, sin embargo, su origen no guarda relación con el del componente nervioso ni arterial asociado a cada uno de los arcos branquiales (Glennner y Crimley 1974).

A excepción del cuerpo carotídeo, el cual tiene una localización constante en la bifurcación carotídea, el resto de los paraganglios parasimpáticos mantienen una gran variabilidad tanto en el número como en la localización (Zak y Lawson, 1983).

1.3. PARAGANGLIOS LARINGEOS.

1.3.1. Localización de los paraganglios laríngeos

En 1963, Watzka describe por primera vez en una laringe adulta humana la existencia de un par de estructuras paraganglionares, que siguiendo la antigua subdivisión son considerados como no cromafines, localizados en las ramificaciones del nervio laríngeo interno adyacentes al margen superior del cartílago tiroideos. Un año más tarde Kleinssaser (1964) describe en una laringe de un neonato humano la existencia de un nuevo par de estructuras paraganglionares, de las mismas características que las descritas por Watzka (1963), pero esta vez asociados al nervio recurrente y situadas por detrás de la articulación cricotiroidea.

El paraganglio descrito por Watzka (1963) correspondía a una pequeña estructura que medía aproximadamente 0,1-0,3 mm. a la que se denominó paraganglio laríngeo superior. Mientras que el descrito por Kleinssaser (1964) era una estructura de menor tamaño que el anterior, comprendida entre 0,3-0,4 mm. y a la que se denominó paraganglio laríngeo inferior.

Se ha descrito también una tercera estructura paraganglionar impar en la laringe, el paraganglio laríngeo anterior, localizado por delante de la membrana cricotiroidea, aproximadamente en su línea media, y asociado al nervio laríngeo externo (Kleinssaser, 1966).

A estos trabajos les fueron siguiendo otros realizados en material humano procedente de prematuros y recién nacidos (Jansen y Netty-Marbell, 1967; Schönberg, 1969; Lawson y Zak, 1974) o adultos (Lawson y Zak, 1974; Dahlqvist y col., 1986 b).

En los prematuros y recién nacidos humanos el paraganglio laríngeo superior se describió en la misma posición que la descrita por Watza (Jansen y Netty-Marbell, 1967; Schönberg, 1969). Sin embargo, mientras que para unos autores aparecía de manera constante (Schönberg, 1969), para otros sólo estaba presente en la mitad de la muestra examinada (Jansen y Netty-Marbell, 1967). Al paraganglio laríngeo inferior se le ha descrito de manera constante pero situado más inferiormente que en la posición descrita por Kleinssaser, entre el cartílago cricoides y primer anillo traqueal (Jansen y Netty-Marbell, 1967).

Por el contrario, en las laringes adultas al paraganglio laríngeo superior se le ha descrito por algunos autores como una estructura inconstante (Lawson y Zak, 1974), de pequeño tamaño y esférica localizada en la misma posición que la descrita inicialmente por Watza (1964), aunque se podían encontrar pequeñas variaciones de situación con respecto al borde superior del cartílago tiroides, bien por encima o bien por debajo (Zak y Lawson, 1972; Lawson y Zak, 1974) (Figura 1.1a). Al paraganglio laríngeo inferior también se le ha descrito como una estructura inconstante (Dahlqvist y col., 1986 b), aunque con una mayor incidencia que la del superior (Lawson y Zak, 1974). Se le ha descrito con un tamaño en ocasiones mayor que el del paraganglio superior y bajo la forma de regueros o pequeños agregados celulares, situado mucho más frecuentemente entre el cartílago cricoides y primer anillo traqueal que a nivel de la articulación cricotiroidea, observándosele en algunos casos en íntimo contacto con la cápsula de la glándula tiroidea (Zak y Lawson, 1972; Lawson y Zak, 1974) (Figura 1.1a).

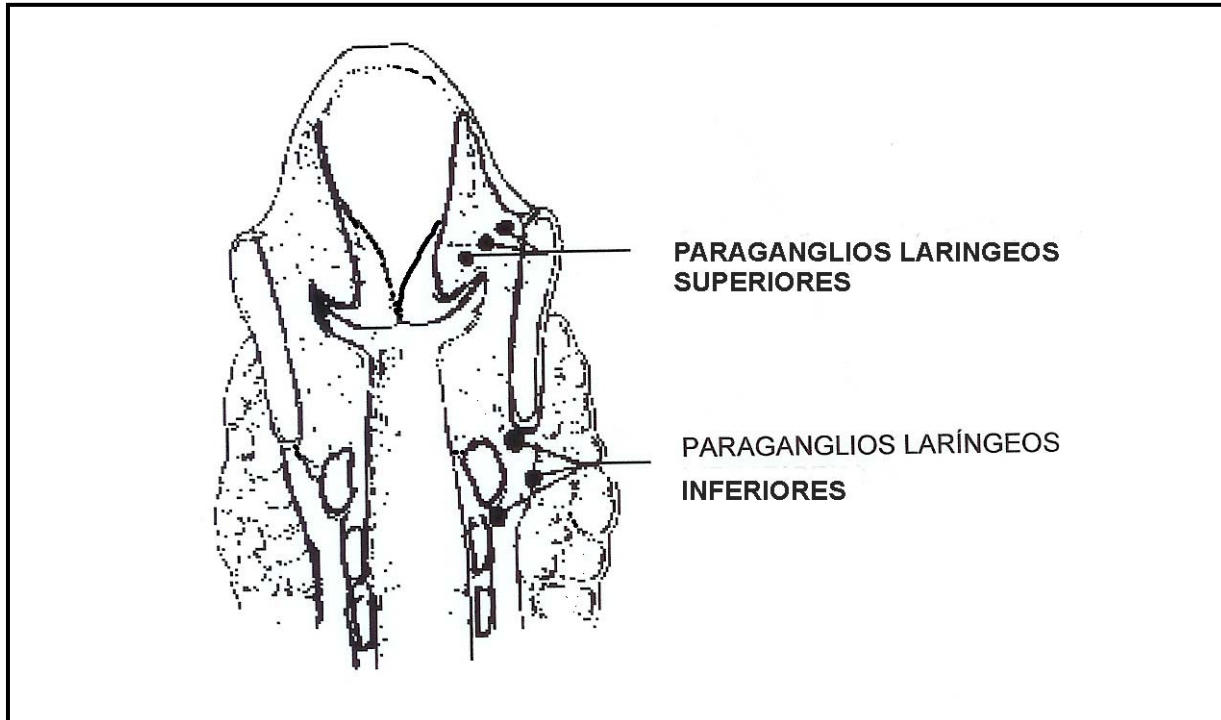


Figura 1.1.a. Esquema de la distribución de los paraganglios laríngeos en el adulto humano. (Modificado de Lawson y Zak, 1974)

Además de estos paraganglios han sido descritos de manera ocasional una serie de estructuras paraganglionares consideradas como ectópicas (Lawson y Zak, 1974). Una localizada por delante del cartílago cricoides que se le considera como paraganglio ectópico inferior y otra situada posteriormente, cerca de la línea media del borde superior del cartílago cricoides o por encima del músculo aritenóideo considerado como un paraganglio ectópico superior (Lawson y Zak, 1974). En la figura 1.1.b, estos paraganglios ectópicos aparecen marcados como puntos de color rojo para diferenciarlos del resto de paraganglios que aparecen señalados mediante puntos negros.

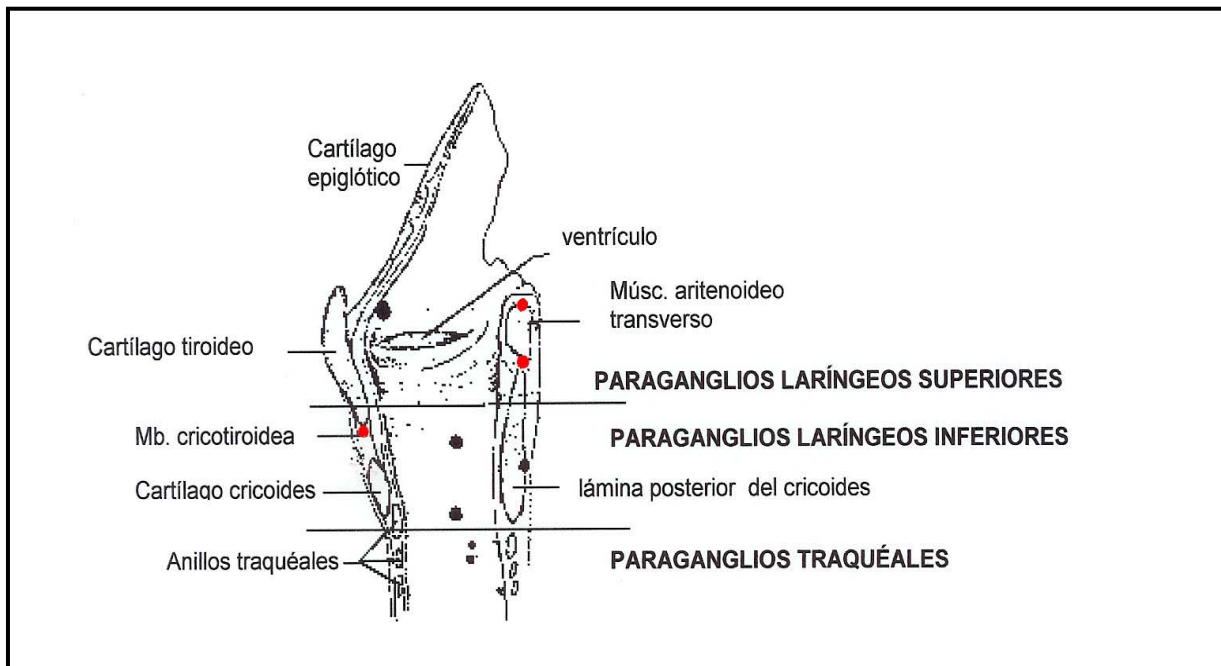


Figura 1.1.b. Distribución de los paraganglios laríngeos en el adulto humano en una visión lateral de la laringe. (Modificada de Lawson y Zak, 1974). Los puntos rojos representan los paraganglios ectópicos.

El paraganglio laríngeo anterior descrito inicialmente por Kleinsasser (1964) no ha sido posteriormente referido por ningún otro autor, aunque por su localización, anterior a la membrana cricotiroidea, guarda relación con el paraganglio laríngeo inferior ectópico descrito por Lawson y Zak (1974), pudiéndose tratar, por tanto, de la misma estructura.

Un factor importante a tener presente en relación con el número y localización de los paraganglios es que estos experimentan a lo largo de la vida un cambio tanto en su número, tamaño y distribución (Glennner y Grimley, 1974; Dyson, 1995; Tischler, 1997). La mayor parte del sistema paraganglionar, especialmente, el tejido paraganglionar simpático, degenera después de nacimiento (Coupland, 1965). El tejido paraganglionar parasimpático también degenera en la mayor parte de sus localizaciones, sin embargo, ha sido descrito que en ciertas localizaciones, paraganglios timpánicos, yugulares y en

el cuerpo carotídeo, puede incluso incrementarse (Tischler, 1997). Estos hechos podrían justificar las variaciones de número referidas anteriormente entre los estudios basados en muestras de fetos y adultos humanos.

La existencia de paraganglios laríngeos también ha sido descrita en diferentes animales de experimentación.

Por ejemplo, en ratas adultas, la presencia de paraganglios asociados a los nervios laríngeos interno y recurrente, al igual que en humanos, se ha descrito con variaciones en cuanto a su número y localización (Gorgas y Böck 1976; Carlsöö y col., 1982; Carlsöö y col., 1983; Dahlqvist y col., 1986 a; Dahlqvist y col., 1987; Domeij y col., 1987). En el nervio laríngeo superior, se han descrito de manera constante al nivel de la bifurcación de sus ramas interna y externa de uno a tres paraganglios (Domeij y col., 1987). En el recurrente se han descrito antes de entrar en la laringe (Carlsöö y col., 1982; Carlsöö y col. 1983) y en la porción intralaríngea al nivel del cuerno inferior del cartílago tiroides (Gorgas y Böck 1976) en número variable y no siempre constantes (Dahlqvist y col., 1987)

1.3.2. Estructura de los paraganglio laríngeos

Microscópicamente los paraganglios laríngeos humanos se han descrito, al igual que el cuerpo carotídeo, rodeados por una fina capa de tejido conectivo y formados por agrupaciones celulares separadas entre si por tejido conectivo y en contacto con capilares y múltiples fibras nerviosas (Watza, 1963; Kleinssaser, 1964; Jansen y Netty-Marbell, 1967; Schömberger, 1969; Dahlqvist y col 1986 b).

La organización ultraestructural de los paraganglios mejor conocida es la del cuerpo carotídeo pues ha sido sin duda la más estudiada tanto en animales de experimentación como en humanos.

Los paraganglios laríngeos de las ratas presentan, al igual que el cuerpo carotídeo y resto de paraganglios, dos tipos diferentes de células, las llamadas células principales, células glómicas o más habitualmente células tipo I y las células sustentaculares, células satélite o en contraposición con las primeras células tipo II (Carlsöö y col.,1983; Dahlqvist y col., 1984; Domeij y col., 1987).

La principal característica de las células tipo I, es la presencia en su citoplasma de vesículas que por su aspecto a microscopia electrónica se les denomina vesículas densas (dense-cored vesicle, DCV). Se han descrito dos tipos de vesículas en función de su tamaño las llamadas vesículas densas grandes (Large dense-cored vesicle, LDCV) y las vesículas densas pequeñas (Small dense-cored vesicle, SDVC).

En los paraganglios laríngeos de las ratas se distingue una única población de células tipo I dentro de la cual se observan los dos diferentes tipos de vesículas (Dahlqvist y col 1984; Domeij y col 1987; Dahlqvist y col 1987; Lu y col 1992).

Las diferencias de diámetro entre las vesículas pueden representar diferentes

estados funcionales o madurativos (Carlsöö y col., 1983; Dahlqvist y col., 1984) Estas diferencias se mantienen en situaciones de hipoxia, donde ambos tipos de vesículas experimentan un aumento en su volumen (Dahlqvist y col., 1987). Sin embargo, en el cuerpo carotídeo de la rata, las vesículas no siguen una distribución unimodal, distinguiéndose dos subpoblaciones dentro de las células tipo I. Las llamadas tipo I A cuyas vesículas son aproximadamente un 30 % mayores que las presentes en las células llamadas tipo I B (Hellström, 1975; McDonald y Mitchell, 1975). Las implicaciones funcionales de la existencia de estos dos tipos de células aún no han quedado totalmente esclarecidas aunque puede también representar diferentes estados funcionales (Hellström, 1975).

Mediante diferentes métodos como la fluorescencia inducida por el formaldehído (Gorgas y Böck, 1976) o la Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Dahlqvist y col., 1986 a) se confirmó la presencia de catecolaminas en el interior de las vesículas de las células paraganglionares laríngeas. Además se ha demostrado que estas vesículas tienen capacidad para captar falsos neurotransmisores y/o neurotoxinas adrenérgicas (Lu y col., 1992).

A través de diferentes métodos experimentales, simpatectomía química y quirúrgica (Dahlqvist y col., 1989 a) y de estudios inmunohistoquímicos (Dahlqvist y Forsgren, 1992 a) se ha demostrado que la principal catecolamina acumulada en estas vesículas era la Dopamina y en menor proporción la Noradrenalina, tal como ocurría en el cuerpo carotídeo. Por tanto, se puede considerar que las vesículas electrodensas, observadas en microscopia

electrónica, contienen en su interior catecolaminas o las sustancias intermedias en la síntesis de las mismas.

Volviendo a la estructura del paraganglio laríngeo, las células tipo I, como en el cuerpo carotídeo, se hallan agrupadas en una mayor proporción que el tipo II las cuales aparecen en la periferia de estas agrupaciones envolviéndolas y separándolas de una amplia red de capilares y sinusoides vasculares fenestrados (Carlsöö y col., 1983; Dahlqvist y col., 1984; Domeij y col., 1987; Chien y col., 1991).

Entremezcladas y rodeando a las células tipo I existe un gran número de fibras nerviosas, en las que siguiendo únicamente criterios morfológicos se distinguen dos tipos de sinapsis nerviosas, aferentes y eferentes (McDonald y Blewett, 1981; Carlsöö y col., 1983; Domeij y col., 1987). En las sinapsis aferentes, la célula tipo I, representa el componente presináptico de la unión en cuyo citoplasma se encuentran vesículas pequeñas y agranulares así como vesículas más grandes y electrodensas en unas proporciones similares (Figura 1.2). Mientras que en las sinapsis eferentes la célula tipo I es el elemento postsináptico de la unión y en el axolema de la fibra nerviosa predominan las pequeñas vesículas agranulares sobre las de mayor volumen y electrodensas (Figura 1.2). Estos dos tipos de sinapsis también se han podido observar entre las células adyacentes tipo I (Carlsöö y col., 1983). Hasta la actualidad, no ha sido posible distinguir un tercer tipo de sinapsis, las llamadas recíprocas, que si están presentes en el cuerpo carotídeo de la rata (McDonald y Mitchell, 1975), donde además se ha podido observar que la mayoría de las fibras nerviosas contactan con el subtipo I A de las células paraganglionares y apenas si lo hacen con el subtipo I B.

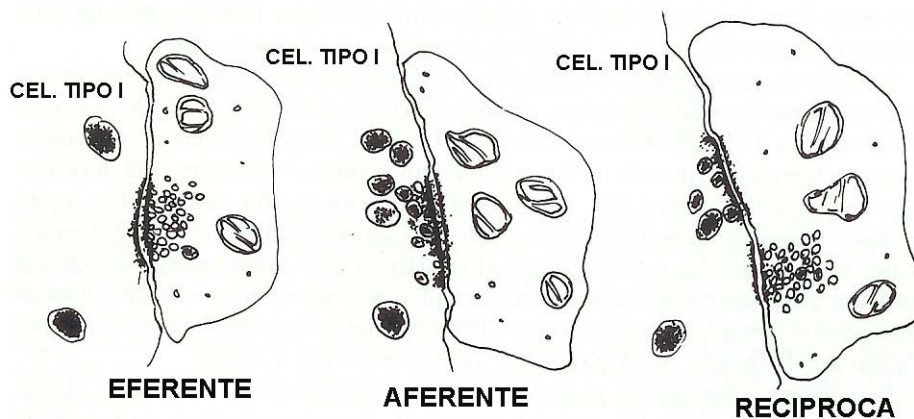


Figura 1.2 Esquema de los diferentes tipos de sinapsis (Modificado de Böck, 1982)

Ocasionalmente se han descrito la presencia de células ganglionares autonómicas próximas al paraganglio laríngeo, bien situadas fuera de la cápsula (Domeij y col., 1987) o bien en la vecindad de las agrupaciones celulares (Carlsöö y col., 1983). La hipotética naturaleza atribuida a estas células autonómicas es parasimpática (Carlsöö y col., 1983). La existencia de este tipo de células autonómicas parasimpáticas también ha sido descrita en el cuerpo carotídeo junto a las de naturaleza simpática (Berry y col., 1995). En el cuerpo carotídeo ambos tipos de células ganglionares reciben fibras preganglionares procedentes del seno carotídeo y de los nervios simpáticos respectivamente y aparecen aisladas o en pequeños grupos cerca de la superficie del cuerpo carotídeo (McDonald y Mitchell 1975).

1.3.3. Función de los paraganglios laríngeos

La función de las estructuras paraganglionares de la laringe permanece todavía por esclarecer, aunque todas las descripciones existentes sobre ellas las consideren implicadas en un arco reflejo que regularía la resistencia de la laringe al paso de la columna aérea en función de la oxigenación de la sangre. La posible función quimiorreceptora atribuida a estas estructuras, modularía este arco reflejo de un modo similar a como lo hace el cuerpo carotídeo que controla la respuesta respiratoria en función de los niveles de oxigenación de la sangre. (Carlsöö y col., 1982, 1983; Dahlqvist y col., 1984, 1986 b, 1987, 1990, 1991, 1992 b; Domeij y col., 1987).

Existen diferentes hipótesis sobre como se realiza ese mecanismo de regulación. Estas hipótesis intentan extrapolar al paraganglio laríngeo el modelo funcional del cuerpo carotídeo basándose en algunos trabajos experimentales realizados en ratas, en los que los paraganglios laríngeos han demostrado similares respuestas frente a la hipoxia e hipercapnia que las observadas en el cuerpo carotídeo (Dahlqvist y col., 1987 y 1991)

Se sabe que el paraganglio laríngeo de las ratas responde en condiciones de hipoxia con un aumento de tamaño que lleva consigo una hipertrofia de las células tipo I, un aumento de tamaño de las vesículas electrodensas y de la concentración de dopamina (Dahlqvist y col., 1987). Sin embargo, no se ha registrado ningún tipo de variación frente a la hipercapnia (Dahlqvist y col., 1991).

Al igual que sucede en el cuerpo carotídeo la ausencia de una barrera vascular-paraganglio sería la clave que permite el intercambio de productos entre la célula paraganglionar y el torrente sanguíneo (Chien y col., 1991).

Posiblemente las células tipo I del paraganglio laríngeo actúen como el quimiorreceptor primario capaz de captar las variaciones de la presión de oxígeno que se producen en los capilares (Carlsöö y col., 1983). Aunque también parece probable que estas células actúen como interneuronas catecolaminérgicas capaces de modular la sensibilidad de las terminaciones nerviosas quimiorreceptoras (Carlsöö y col., 1983) tal como se describió en el cuerpo carotídeo, de manera que las terminaciones aferentes y las células tipo I cooperarían como unidades quimiorreceptoras (McDonald y Mitchell, 1975).

Más recientemente se han establecido diferentes hipótesis sobre los mecanismos moleculares de las células tipo I implicadas en la quimiorrecepción de oxígeno en el cuerpo carotídeo. La detección del estímulo hipóxico por parte de estas células forma parte de una diferente sensibilidad a la hipoxia y una distinta respuesta efectora, de las que poseen otros grupos de células en el organismo, como las productoras de eritropoyetina o las células musculares lisas de las arterias pulmonares (González y col., 1995).

Dentro de estas hipótesis está el llamado modelo de membrana quimiorreceptora (González y col., 1995). Según este modelo una hemoproteína actuaría como quimiorreceptor sensible al oxígeno que ante su desaturación, provocaría un descenso en la probabilidad de apertura de los canales de K^+ transmembrana (González y col 1995). En estas células tipo I se ha evidenciado, por medio de estudios bioquímicos y farmacológicos, la existencia de un potencial de membrana dependiente de K^+ .

Además estas células contienen en su membrana plasmática canales voltaje dependientes de Na^+ , K^+ , y Ca^{2+} , configurándose como células excitables capaces de despolarizarse. Los descensos de la pO_2 reducirían pues la

capacidad de apertura de los canales de K^+ desencadenando una despolarización, que provocaría la entrada de Ca^{2+} intracelular a través de los canales voltaje-dependientes de Ca^{2+} , activándose la vía del AMP_c acoplada y produciéndose la liberación de dopamina probablemente modulada por una prostaglandina E_2 (González y col 1995).

Existen otros modelos de quimiorrecepción como la hipótesis metabólica (Anichkov y Belen'kii, 1963) según la cual la acumulación de metabolitos tóxicos durante la hipoxia, niveles bajos de ATP, existencia de citocromo oxidasa específica en las mitocondrias o el estado redox serían los estimulantes. Estas teorías hoy en día son muy discutidas y prácticamente han sido abandonadas.

La localización de los paraganglios laríngeos y sus similitudes morfológicas con el cuerpo carotídeo permiten considerar que puedan actuar como quimiorreceptores y contribuir, por tanto, a los mecanismos que controlan la ventilación y la resistencia aérea laríngea como ha sido propuesto por los investigadores suecos (Carlsöö y col., 1982, 1983; Dahlqvist y col., 1984, 1986 b, 1987, 1990, 1991, 1992 b; Domeij y col., 1987).

Sin embargo, no debemos olvidar que una función quimiorreceptora en la laringe también ha sido planteada al margen de la existencia de los paraganglios laríngeos. Las estructuras quimiorreceptoras en este caso parecerían residir en una serie de terminaciones nerviosas aferentes amielínicas que abandonarían la laringe a través de los nervios recurrentes (Widdicombe, 1973). La estimulación de tales terminaciones, motivadas por la presencia de gas amonio, humo del tabaco y bajas concentraciones de CO_2 , desencadenarían

un potente reflejo en el sistema nervioso central sobre las estructuras que controlan la respiración (Wyke y Kirchner, 1976).

1.3.4. Inervación del paraganglio laríngeo

Este punto resulta clave para poder entender el funcionamiento de estas estructuras. De nuevo la inervación mejor conocida es la del cuerpo carotídeo (De Castro, 1928; McDonald y Mitchell, 1975; González y col., 1995). Del total de las fibras que inervan al cuerpo carotídeo, el 95 % se consideran axones aferentes que presumiblemente se originan en el ganglio petroso, ganglio sensitivo del nervio glossofaríngeo, y abandonan el cuerpo carotídeo a través del nervio del seno carotídeo. Tan sólo un 5% son axones eferentes preganglionares procedentes del tronco simpático cervical que entran en el cuerpo carotídeo en compañía de los axones postganglionares que proceden del ganglio simpático cervical (De Castro, 1928; McDonald y Mitchell, 1975).

En cuanto a la inervación del paraganglio laríngeo se disponen de muy pocos datos. Parece, sin embargo, bastante probable, que la inervación sensitiva del paraganglio laríngeo, inervación aferente, tenga sus cuerpos neuronales en los ganglios nodoso y yugular del nervio vago (Dahlqvist y col., 1986 c, 1989 b, 1990, 1994; Uno y col 1996). Esta vía quimiorreceptora se inicia probablemente en las terminaciones nerviosas aferentes y las células tipo I, que actúan como unidades quimiorreceptoras (Figura 1.3, flecha roja).

Las células y/o ganglios locales descritos por algunos autores en la vecindad de los paraganglios laríngeos, de probable naturaleza parasimpática, parecen contribuir a la inervación eferente del paraganglio representando una posible vía vasodilatadora, donde los axones postganglionares de estas células inervarían las paredes de los vasos arteriales (Dahlqvist y Forsgren, 1989 b; Dahlqvist y col., 1994; Lidergran y col., 1995) (Figura 1.3, flecha azul).

Estos dos aspectos sobre la inervación del paraganglio parecen haber sido confirmados por medio de trabajos que combinan el uso de trazadores anterógrados con experimentos de denervación (Dahlqvist y col., 1994). Sin embargo, el origen de las fibras simpáticas es el punto más controvertido, mientras que inicialmente se pensó que el ganglio cervical superior contribuía a la inervación de las células paraganglionares laríngeas (Lundberg y col., 1982; Dahlqvist y col 1986 c; Domeij y col., 1991a) este, actualmente se considera que únicamente inerva las paredes de las arterias y arteriolas produciendo una vasoconstricción (Figura 1.3, flecha de color naranja) y se baraja la posibilidad que sea el ganglio cervical inferior o los ganglios paravertebrales quienes inerven propiamente el paraganglio laríngeo (Dahlqvist y col 1994) (Figura 1.3, flecha verde).

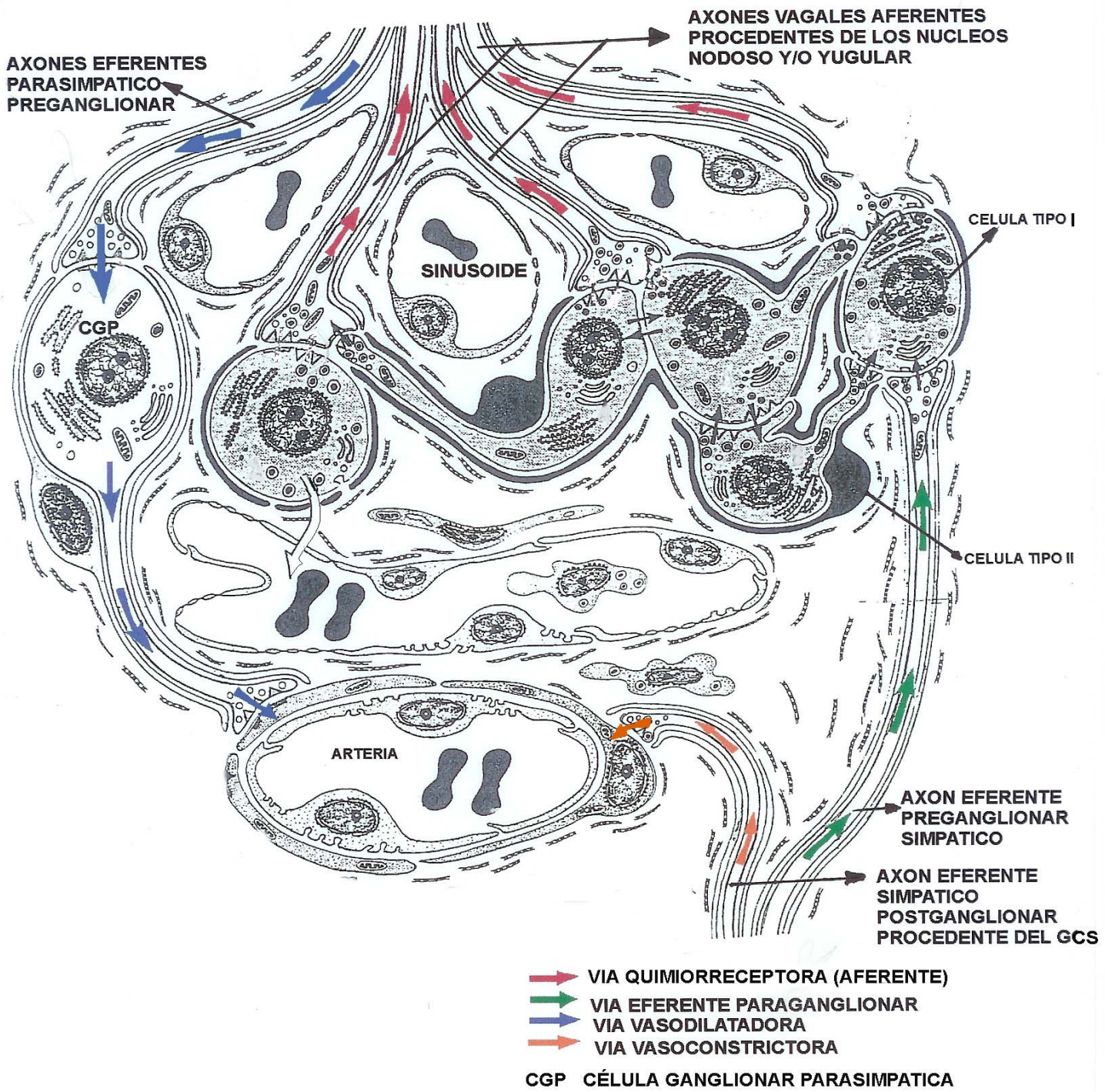


Figura 1.3 Esquema de la inervación del paraganglio laringeo (Imagen tomada y adaptada del Gray's Anatomy 1995)

1.3.5 Péptidos reguladores implicados en la inervación de los paraganglios laríngeos

La inervación de los paraganglios laríngeos, como se deduce del apartado anterior, es compleja y existen puntos aún por esclarecer. La investigación de las sustancias neuroactivas o péptidos reguladores presentes en estos paraganglios puede proporcionar información que clarifique algunos de estos aspectos.

Los péptidos reguladores pueden ejercer su función bien como neurotransmisores bien como neuromoduladores.

El neurotransmisor se define como aquella sustancia que es sintetizada y almacenada en las neuronas, para ser liberada durante la actividad nerviosa e interactuar con receptores específicos en la membrana postsináptica provocando cambios en la actividad postsináptica (Hökfelt y col., 1986).

El neurotransmisor genera una respuesta rápida en su inicio y de corta duración (Hisa y col., 1999). A nivel de la laringe los dos neurotransmisores clásicamente admitidos son la acetilcolina y la noradrenalina que participan en la inervación autónoma y somática de la laringe (Hisa y col 1999). De tal forma que las fibras noradrenérgicas se han encontrado distribuidas alrededor de las paredes de las arterias y arteriolas (Hisa, 1982 a; Domeij y col., 1991 a; Uno y col., 1992), en los músculos intrínsecos laríngeos (Hisa, 1982 a; Yoshida y col 1992) y en las glándulas (Hisa, 1982 a; Hisa y col., 1982 b). Un patrón similar también se ha descrito para las fibras colinérgicas que se han encontrado en las paredes de los vasos, glándulas (Domeij y col., 1991 a; Nakanishi y col., 1999) y en los músculos intrínsecos laríngeos (Nakanishi y col., 1999).

El neuromodulador es una sustancia que potencia o bloquea los efectos de los neurotransmisores (Hisa y col 1999). Puede proceder de la circulación o de tejidos locales no neuronales, o bien más frecuentemente de la propia fibra nerviosa donde coexiste con el neurotransmisor.

A nivel de la laringe se han descrito numerosos peptidos neuromoduladores de los que haremos un breve comentario antes de determinar su distribución en los paraganglios laríngeos.

Polipéptido Intestinal Vasoactivo (Vasoactive Intestinal Polypeptide, VIP)

Es un péptido regulador formado por 28 aminoácidos identificado por primera vez en el duodeno de los cerdos en 1970 por Said y Mut.

A nivel de la laringe ha sido descrito especialmente abundante alrededor de las glándulas seromucosas y paredes arteriales (Uddman y col., 1978; Basterra y col., 1989; Kawasoe y col., 1990; Luts y col., 1990, 1993; Domeij y col., 1991 a; Masuko y col., 1991; Hauser-Kronberger y col., 1993; Tanaka y col., 1995; Lidegran y col., 1995). En menor proporción también se ha encontrado VIP en la lámina propia, en los cartílagos (Domeij y col., 1991 a), en los músculos de los pliegues vocales (Luts y col 1990), en la musculatura lisa (Luts y col. 1993) y en el epitelio (Kawasoe y col.,1990, Hauser-Kronberger y col 1993).

Se ha descrito que la función del VIP en la laringe es regular el calibre de los vasos produciendo vasodilatación y reducción de la secreción de las glándulas seromucosas (Uddman y col 1978; Basterra y col 1989; Hauser-Kronberger y col 1993; Hisa y col 1999).

Neuropeptido –Y (NP-Y)

Fue aislada por Tatemoto en 1982, esta formada por 36 aminoácidos, estructuralmente está relacionado con el polipéptido pancreático y el péptido YY con los que presenta una homología en 18 y 25 residuos acídicos.

A nivel de la laringe se ha descrito especialmente presente en las paredes de las arterias (Basterra y col.,1989; Luts y col.,1990; Kawasoe y col., 1990; Domeij y col.,1991 a; Masuko y col.,1991; Albegger y col., 1991; Hauser–Kronberger y col., 1993; Luts y col. 1993). En mucha menor proporción se ha descrito presente alrededor de los ductus y acinis de las glándulas exocrinas de la laringe (Basterra y col., 1989; Domeij y col., 1991 a; Hauser-Kronberger y col., 1993; Luts y col., 1993; Tanaka y col., 1995). En estas dos últimas localizaciones, estudios de co-localización han demostrado su asociación al VIP (Domeij y col., 1991 a; Luts y col., 1993). También se ha descrito a nivel de la lámina propia, en el pericondrio (Domeij y col.,1991 a) y en el músculo estriado (Luts y col., 1993).

La función principal del NP-Y en la laringe es la de actuar como un potente vasoconstrictor, mientras que apenas tiene influencia sobre la secreción exocrina de las glándulas (Hisa y col 1999).

Sustancia P (SP)

Fue descubierta en 1931 por Von Euler y Gaddum quienes lo aislaron en extracto de cerebro e intestino de conejo. Es un péptido de 11 aminoácidos cuyo fragmento C-terminal es más activo que el N-terminal y forma parte de la familia de las taquininas, llamadas así por su capacidad de producir un rápido efecto espasmogénico en el intestino.

La SP se ha encontrado presente en las terminaciones libres del epitelio de la mucosa laríngea (Hisa y col., 1985; Shin y col., 1987 b; Kawasoe y col., 1990; Masuko y col., 1991; Domeij y col., 1991 b; Hauser-Kronberger y col., 1993; Tanaka y col., 1993 a; Lidegran y col., 1995; Yoshida y col., 2000). Algunos autores han descrito diferencias regionales en su distribución, observándolas especialmente abundantes en la mucosa y epitelio de la región posterior de la glotis y en la cara dorsal de la epiglotis y prácticamente ausentes en la parte membranosa de los pliegues vocales (Lundberg y col., 1984; Domeij y col., 1991b; Tanaka y col., 1993 a; Yoshida y col., 2000) donde, sin embargo, algún autor contrariamente describe la existencia de un abundante número de fibras positivas para la SP (Shin y col., 1987 b). También se ha descrito la presencia de SP alrededor de las glándulas laríngeas y de los vasos sanguíneos (Hisa y col., 1985; Shin y col., 1987 b; Frigo y col., 1989; Kawasoe y col., 1990; Masuko y col., 1991; Domeij y col., 1991b; Hauser-Kronberger y col., 1993; Tanaka y col., 1993 a; Lidegran y col., 1995; Yoshida y col 2000).

En el ámbito laríngeo la SP fue el primer neuropeptido que se descubrió como candidato a neurotransmisor sensitivo en el sistema aferente laríngeo (Hisa y col., 1985) donde probablemente actúa modulando los impulsos aferentes (Shin y col., 1987 a). A nivel de los vasos y glándulas actúa produciendo vasodilatación y estimulando la secreción glandular (Shin y col 1987 b; Hisa y col 1985, 1999).

Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (Calcitonin Gene-Related Peptide, CGRP)

Es un polipéptido de 37 aminoácidos, descubierto por Amara y colaboradores en 1982 por medio de técnicas de genética molecular al estudiar la secuencia de nucleótidos de la transcripción del gen de la calcitonina de la rata.

En la laringe se ha descrito principalmente distribuido en el epitelio de la mucosa laríngea (Cadieux y col., 1986; Kawasoe y col., 1990; Luts y col., 1990; Domeij y col., 1991 b; Masuko y col., 1991; Hisa y col., 1992; Tanaka y col., 1993 a; Lidegran y col., 1995; Yoshida y col., 2000). Su patrón de distribución se le ha considerado muy similar al de la SP (Kawasoe y col 1990; Domeij y col 1991b; Hisa y col. 1992; Hauser-Kronberger y col. 1993; Tanaka y col 1993 a; Dalqvist y col., 1994; Yoshida y col., 2000), existiendo un mayor número de fibras positivas para el CGRP que para la SP (Hisa y col. 1992, 1994). Sin embargo, otros autores han descrito que ambas fibras se encuentran en proporciones muy similares (Kawasoe y col 1990; Tanaka y col 1993 a).

Se han encontrado además fibras positivas para el CGRP alrededor de las paredes de los vasos (Cadieux y col., 1986; Kawasoe y col., 1990; Luts y col., 1990; Domeij y col., 1991 b; Masuko y col., 1991; Hisa y col., 1992; Luts y col., 1993; Tanaka y col., 1993 a; Yoshida y col., 1993, 2000; Dahlqvist y col., 1994) y a nivel de las glándulas (Cadieux y col., 1986; Luts y col., 1990, 1993; Domeij y col., 1991 b; Hisa y col., 1992; Yoshida y col., 1993, 2000; Lidegran y col., 1995, Tanaka y col., 1995).

También ha sido descrita la presencia de CGRP en las placas motoras de los músculos intrínsecos (Cadieux y col., 1986; Hisa y col., 1992; Tanaka y col.,

1993 a), extrínsecos (Cadieux y col., 1986) y en las articulaciones de la laringe (Domeij y col., 1991 b).

Las fibras CGRP distribuidas por el epitelio en las que parecen coexistir con la SP podrían pertenecer al grupo de fibras-C-aferentes que están involucradas en la transmisión del dolor (Kawasoe y col., 1990; Hisa y col 1994) y que pueden además constituir el brazo aferente de los reflejos protectores de la vía aérea tales como la tos y la producción de secreciones (Karlsson y Persson, 1991); las distribuidas por las articulaciones podrían actuar como mecanoreceptores y estar involucradas en la información sensitiva aferente para el control de los movimientos de los cartílagos y músculos (Domeij y col., 1991 b); las presentes en las paredes vasculares actuarían produciendo vasodilatación por acción directa sobre la musculatura lisa de las paredes de los vasos (Solway y Leff, 1991) y, por último, las presentes en las placas motoras parece probable que actúen regulando la síntesis y sensibilidad de los receptores de acetilcolina (Lee y col., 1992; Hisa y col., 1992). Por tanto, el CGRP puede actuar en la laringe como neuromodulador de tres sistemas diferentes, sistema sensorial aferente, sistema autónomo y sistema motor eferente (Hisa y col., 1992). El uso combinado de trazadores retrógados y técnicas de inmunohistoquímica han confirmado la presencia de neuronas CGRP positivas en el ganglio nodoso que se proyectan hacia la mucosa laríngea apoyando el papel que puede jugar este neuropéptido como transmisor de información sensitiva visceral de la laringe (Tanaka y col 1993 c).

Enkephalin (ENK)

El pentapéptido metionina-leucina-encefalina fue descrito por primera vez en el cerebro del cerdo (Hughes y col., 1975). Son considerados como péptidos opioides con acciones analgésicas muy similares a las descritas para la morfina. Se ha descrito su presencia en las laringes de ratas (Domeij y col 1991c) y perros (Kawasoe y col 1990, Masuko y col 1991; Hisa y col 1994). La mayoría de las fibras ENK positivas se han descrito distribuidas en la vecindad de las glándulas (Domeij y col., 1991c), mientras que no se han encontrado fibras en las paredes de los vasos ni en el epitelio laríngeo (Domeij y col., 1991c). Su papel en la laringe permanece todavía por esclarecerse.

Oxido nítrico (ON)

Ha sido uno de los últimos neurotransmisores descritos. Se localizó inicialmente en un número de subpoblaciones celulares tanto en el sistema nervioso central como en el periférico (Snyder, 1992). Dada la imposibilidad de detectar directamente la presencia de ON ya que desaparece en pocos segundos y no se acumula en el interior de las neuronas (Hisa y col 1999) se utilizan técnicas de inmunohistoquímica frente a enzimas involucradas en su síntesis, como es la oxido nítrico sintetasa (ONS) y la nicotinamida adenina dinucleotido fosfato-diaforasa (NADPHd) (Hope y col., 1991).

Se ha descrito la presencia de fibras NADPH-d positivas en el epitelio de la mucosa de la cara laríngea de la epiglótis y subglótis, en las glándulas, en las paredes vasculares y en el músculo tiroaritenideo (Hisa y col., 1996 b).

Dada la distribución del ON en las fibras en el epitelio y su presencia en el ganglio nodoso (Lü y col., 1994) se ha postulado que probablemente tenga una función nociceptiva (Hisa y col., 1996 b,1999). Su distribución en las paredes

de los vasos y glándulas (Hisa y col., 1996 b, c) hace pensar que el ON este también involucrado en el control del flujo sanguíneo y secreciones laríngeas (Hisa y col., 1996 c, Hisa y col., 1999). Concretamente, la ONS ha sido colocalizada con el VIP en las paredes vasculares, lo que sugiere un papel de mediador del ON con el VIP y la acetilcolina produciendo vasodilatación (Kummer y col., 1992)

El ON también se ha relacionado con procesos degenerativos dado que se ha observado la presencia de ONS en las motoneuronas, que en condiciones normales es indetectable (Wu y Li, 1993). En animales de experimentación se ha podido demostrar que la inducción de ONS tras la sección nerviosa y, por tanto, la muerte de las motoneuronas puede ser prevenida tras la implantación de un injerto de nervio periférico en el lugar de la lesión, posiblemente los factores neurotróficos producidos por las células de Schwann del nervio injertado modifiquen la expresión del ONS mejorando la supervivencia de las motoneuronas (Wu y col 1994).

Neuropéptidos, fibras, ganglios y paraganglios.

Retomando la inervación del paraganglio laríngeo, los trabajos de inmunohistoquímica realizados en los animales de experimentación, han demostrado la participación de una gran parte de los péptidos mencionados anteriormente (VIP; NPY, SP, CGRP. ENK, NO) como neuromoduladores de dicha inervación.

Al nivel de las varicosidades de las terminaciones nerviosas que inervan el paraganglio se ha encontrado de forma especialmente abundante VIP y NP-Y y en menor grado SP y CGRP (Dahlqvist y Forsgren, 1989 b; Dahlqvist y col., 1990; Lidégran y col., 1995) no encontrándose positividad para la ENK

(Dahlqvist y Forsgren 1989 b; Dahlqvist y col., 1990). Sin embargo, en el interior de las células tipo I no se demostró positividad para ninguno de los neuropeptidos, en cambio si para la tirosina hidroxilasa (TH) que es la principal enzima limitante de la síntesis de catecolaminas (Dahlqvist y col., 1992 a; Lidegran y col., 1995).

Al nivel de las células ganglionares y/o ganglios locales autónomos situados en su vecindad se ha demostrado también una evidente positividad para el VIP y NP-Y y ENK mientras que la SP y la CGRP fueron claramente negativos (Dahlqvist y col., 1989 b).

Trabajos de inmunohistoquímica acoplados a técnicas experimentales de denervación demostraron por un lado que la vagotomía originaba la desaparición de la SP y del CGRP del paraganglio confirmando el origen de estas fibras en los ganglios sensitivos del vago, mientras que por otro ni la simpatectomía ni la vagotomía variaban el patrón de distribución del NP-Y ni del VIP y que por tanto el origen de estos neurotransmisores estaría en los ganglios o células ganglionares locales de posible naturaleza parasimpática y cuya función como ya hemos señalado sería en contribuir a inervar a los paraganglios (Dahlqvist y col., 1994).

Por tanto, lo anteriormente expuesto viene a apoyar lo ya comentado en el apartado anterior de la inervación, donde la vía aferente del paraganglio laríngeo tendría su origen en los ganglios sensitivos del vago (nodoso y/o yugular) y parte de la inervación eferente residiría en los ganglios locales posiblemente parasimpáticos.

1.4. GANGLIOS AUTÓNOMOS LARINGEOS.

Hasta ahora hemos planteado la hipótesis de que en la laringe las estructuras asociadas a los nervios laríngeos son paraganglios donde algunos autores además han descrito en diferentes animales de experimentación, y en fetos humanos la existencia de, células autonómicas parasimpáticas situados en la periferia del paraganglio. Por el contrario, otros muchos autores no reconocen a las estructuras asociadas a los nervios laríngeos como paraganglios, con o sin células autonómicas, sino como puros ganglios autónomos. Estos autores, por tanto, niegan la existencia de estructuras paraganglionares en la laringe y aceptan la única existencia de ganglios de tipo autónomo situados en localizaciones similares a las descritas para los paraganglios (Cadieux y col., 1986; Luts y col., 1990; Masuko y col., 1991; Tsuda y col., 1992; Tanaka y col., 1993 b; Yoshida y col., 1993, 2000; Ramaswamy y col., 1994; Hisa y col 1996 b, c; Nakanishi y col., 1999;).

A continuación pasaremos a conocer cual es la naturaleza y función atribuida a estos ganglios por parte de estos autores dentro de la laringe.

1.4.1. Naturaleza de los ganglios autónomos de la laringe

Los estudios inmunohistoquímicos, realizados en animales de experimentación, han permitido conocer el perfil peptidérgico de estas estructuras ganglionares.

El VIP y el NP-Y son los dos neurotransmisores que se han encontrado presentes en la mayoría de las células ganglionares descritas en el perro (Masuko y col., 1991), rata (Dahlqvist y col., 1989 b; Luts y col., 1990; Domeij y col., 1991 a, d; Lidergran y col., 1995) y gatos (Tsuda y col., 1992; Yoshida y col., 1993). Este dato hace pensar en una posible co-expresión de ambos neuropeptidos, hecho que ha quedado confirmado en trabajos de doble marcaje (Masuko y col., 1991; Domeij y col., 1991 a).

La SP ha sido descrita en el interior de un número muy reducido de células en los ganglios de laringes caninas (Masuko y col., 1991) y de gatos (Tsuda y col., 1992; Yoshida y col., 1993, 2000). Sin embargo, en las ratas en condiciones normales no se encontraron células positivas para la SP (Dahlqvist y col., 1989 b; Lidegran y col., 1995) pero llamativamente en las ratas irradiadas se detectó la presencia de SP en el interior de algunas células ganglionares así como un aumento en la expresión de este neuropeptido a nivel de las glándulas submucosas (Lidegran y col., 1995). También en la periferia de estos ganglios, en humanos se encontró positividad para este neuropeptido (Frigo y col., 1989).

En referencia al CGRP los resultados son menos uniformes que los obtenidos para el resto de los neuropeptidos. En los ganglios intralaríngeos de los gatos no se encontró células positivas para este neuropeptido (Dahlqvist y col., 1989 b; Tsuda y col., 1992; Yoshida y col., 1993, 2000;) o bien sólo un número muy reducido de ellas mostraban en su interior positividad para el CGRP (Tanaka y

col., 1993 b; Lidegran y col., 1995). Al igual sucedía en las ratas donde, unos autores no encontraban células positivas (Domeij y col., 1991 b) y otros describían la existencia de un escaso número de células positivas (Cadieux y col., 1986; Dalqvist y col., 1994). En las laringes caninas no se hallaron células positivas para el CGRP (Masuko y col., 1991).

En un número reducido de células se encontró positividad para la ENK en las laringes caninas (Masuko y col., 1991) y en las de ratas (Domeij y col., 1991c, Lidegran y col., 1995). En algunas de estas células apareció co-expresado con el NP-Y y el VIP (Domeij y col., 1991d).

El NADPHd, marcador del ON, también ha sido descrito en el interior de las células de los ganglios asociados a los nervios intralaringeos de las ratas (Neuhuber y col., 1994; Hisa y col., 1996 b) y de los perros (Hisa y col., 1996 c). Estudios de doble marcaje han demostrado que la mayor parte de estas células también se co-expresaban junto al VIP (Hisa y col., 1996 c).

A parte de determinar el perfil de los neuromoduladores presentes en estos ganglios también ha sido establecido el tipo de neurotransmisor utilizado.

Los estudios inmunohistoquímicos demostraron en animales de experimentación la presencia en el interior de las células ganglionares laríngicas de acetilcolinesterasa (AChE) enzima que cataliza la acetilcolina (Domeij y col., 1991 a, b; Yoshida y col., 1993; Lidegran y col., 1995). Más recientemente también se ha demostrado la presencia en dichas células de una acetil colinatransferasa periférica (pChAT) que resulta ser un marcador más específico de células y/o fibras colinérgicas periféricas (Nakanishi y col., 1999).

Por tanto, la presencia de AChE, pChAT y VIP presentes en el interior de las células ganglionares implica con toda probabilidad la naturaleza parasimpática

de estas estructuras (Masuko y col., 1991; Domeij y col 1991 a, d; Tsuda y col., 1992; Yoshida y col., 1993; Tanaka y col., 1993 b; Lidegran y col., 1995; Hisa y col., 1996 b, c; Nakanishi y col., 1999). En estos casos el ON también sería un modulador endógeno de la neurotransmisión colinérgica en la laringe (Hisa y col., 1996 b), tal como también ha sido descrita en las vías respiratorias de la cobaya (Belsi y col., 1991). La ENK también contribuiría como neuromodulador en la transmisión colinérgica en dichas estructuras (Masuko y col., 1991; Domeij y col., 1991c). El único dato que faltaría por encuadrar en esta descripción sería la presencia del NP-Y, neuromodulador clásicamente adrenérgico, co-expresado junto al VIP. Esta co-expresión ya ha habido sido descrita en otras células ganglionares como las presentes en los ganglios traqueales y bronquiales (Lundberg y col., 1983), en las de los ganglios tiroideos (Grunditz y col., 1988), en las de los ganglios mioentéricos y submucosos del intestino (Ekblad y col., 1984) etc. Por tanto, se ha ido dejando al margen la clásica idea del NP-Y como neuromodulador presente exclusivamente de células simpáticas y hoy en día se le considera también participe de la inervación parasimpática (Domeij y col., 1991 a).

Por último a pesar de la idea bastante unánime de considerar estas neuronas como autónomas, la presencia en un número reducido de células positivas para la SP hace que algunos autores también las consideren como parcialmente sensitivas (Tanaka y col., 1993 b).

Aunque apenas existan trabajos que hagan referencia a la ultraestructura de los ganglios laríngeos, los datos de que disponemos nos permite considerar que tienen todas las características para poder ser considerados como ganglios autonómicos de naturaleza parasimpática: por un lado células con todas las

organelas citoplasmáticas propias de una neurona además de numerosas vesículas en su interior de diferentes morfologías y por otro numerosas sinapsis de tipo químico simétricas y asimétricas (Ramaswamy y col., 1994).

1.4.2. Función de los ganglios

Las fibras postganglionares parasimpáticas de estos ganglios intralaringeos podrían ir destinadas a inervar las paredes de las arterias y arteriolas así como a las glándulas (Figura 1.4) controlando la secreción glandular y flujo sanguíneo locales (Masuko y col., 1991; Domeij y col., 1991 a, c; Tsuda y col., 1992; Yoshida y col., 1993; Tanaka y col., 1993 b; Lidegran y col., 1995; Hisa y col 1996 b, c; Nakanishi y col., 1999; Ramaswamy y col., 1994).

Las fibras preganglionares parasimpáticas que reciben estos ganglios procederían posiblemente del núcleo motor dorsal del vago (Yoshida y col 1992).

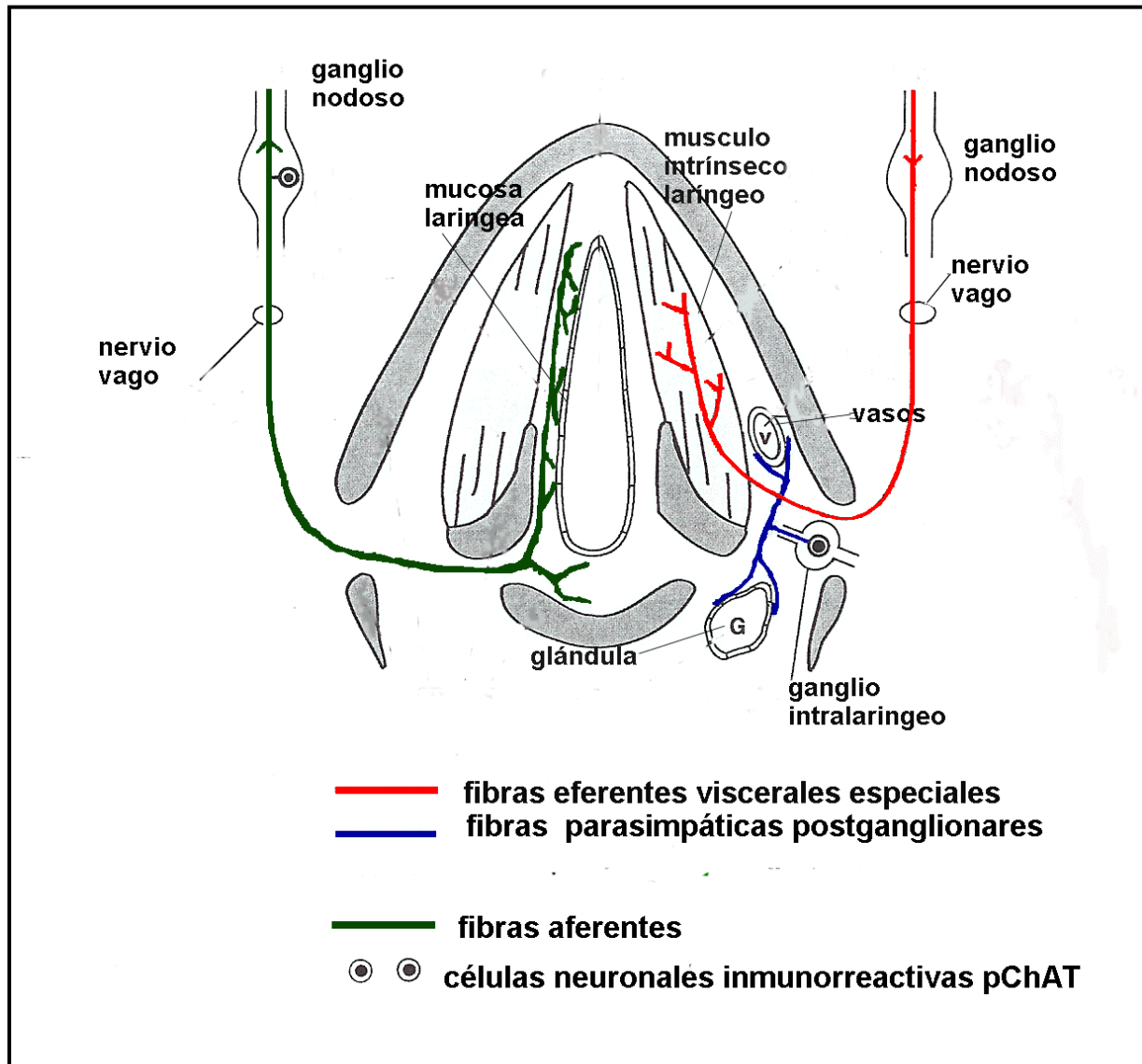


Figura 1.4. Esquema de la inervación parasimpática de la laringe (modificado de Nakanishi 1999). En el lado izquierdo se representa la vía aferente y en el derecho la vía eferente, donde observamos las fibras postganglionares de los ganglios locales destinados a la inervación de los vasos y glándulas

1.4.3. Número y Localización de los ganglios laríngeos en el humano y diferentes especies

La descripción de ganglios nerviosos de tipo autonómico en la laringe en fetos y adultos humanos y en diferentes animales de experimentación es anterior a los trabajos experimentales comentados en los dos apartados anteriores. Revisando todos estos trabajos, los antiguos y modernos, se observa en los mismos una variabilidad en referencia al número y localización de estos ganglios dentro y entre especies que se recoge en la tabla 1.1.

Nos parece especialmente relevante insistir en que a pesar de no haber una localización fija y constante para estos ganglios sin embargo existe un estrecho paralelismo con las localizaciones descritas como paraganglios para otros autores. Otro dato que queremos resaltar es el referente al número que en la mayoría de los casos supera al descrito para los paraganglios donde la mayoría coincidían en describir un único par asociado al nervio laríngeo superior (Watza, 1963; Schömberger, 1969; Jansen y Netty-Marbell, 1967) y otro inferior al nervio recurrente (Kleinsasser, 1964; Jansen y Netty-Marbell, 1967).

| AUTOR/AÑO | MATERIAL/ NUMERO | LOCALIZACION | NUMERO DE GANGLIOS | TAMAÑO |
|------------------------------------|---------------------------------------|---------------|---|-----------------------------------|
| Nicolas 1891 | humanos embriónes (8) | NLI:A 1 | Un par constante | 200-240 μ |
| Grynfelt&Hedon 1908 | humanos fetos y RN (?) | NLI:A1 | 3-5 ganglios | microscópico |
| | | NLI:P1 | SP | SP |
| | | NR:A 3 | 1 ganglio | microscópico |
| Rubatelli 1934 | Humanos embriónes (3) fetos (3) | NLI: H | Un par constante | 250-280 μ X 160- 180 μ |
| | | NLI:P | Un par constante | 60-90 μ X 20-50 μ |
| Barrios 1977 | humanos embriónes y fetos (17) | NLI: H-P | Un par constante | SP |
| | | NR: A | Un par inconstante | |
| Afifi 1971 | humanos adultos (20) y RN (2) | NLI:A 1 | Un par constante | 1-0,5 mm |
| Ramaswamy y Kulasekaran 1974 | humanos adultos (51) y fetos (8) | NLI: A 2 | Un par constante ocasionalmente de 2 a 3 ganglios | Macroscópico (2-3 mm) |
| Geronzi 1094 | Perros (4) Gatos (3) adultos | NR: A 1 | 2-3 ganglios constantes | SP |
| | | NR: A 4 | inconstantes | SP |
| | | NLE | 2-3 ganglios constantes | SP |
| Grynfelt & Hedon 1907 | Perros RN (4) adultos (3) | NLI: A 1 | 2-3 ganglios | 60-230 μ |
| | | NLI: P 1 | 2-3 ganglios | |
| | | NR: A1 | número variable | < tamaño |
| | | Asa de Galeno | 2 ganglios | |
| Sugano 1929 | Perros adultos (?) | NLI: A-P | 1 ganglio | > tamaño |
| | | NR: A-P | varios | < tamaño |
| | | Asa de Galeno | 1 ganglio | < tamaño |
| Lemere 1932 | Perros adultos (10) | NLI: SP | número variable | SP |
| | | NR: A 1 | | |
| | | Asa de Galeno | | |
| Masuko y col. 1991 | Perros adultos (12) | NLSI: SP | 2-3 ganglios | SP |
| | | NR:SP | | |
| Shimazaki y col. 1995 | Perros adultos (5) | NLI: A1 | 1-2 ganglios | 40-70 células |
| | | NR:A1 | 1-2 ganglios | 25-40 células |
| Hisa y col. 1996c | Perros adultos (5) | NLI: A 1 | 1ganglio | SP |
| | | NLI: P 1 | 1 ganglio | SP |
| Tanaka y col. 1993 b | Gatos adultos (12) | NLI: H-P | 1 ganglio | SP |
| | | NR: A | 1 ganglio | |
| Tsuda y col. 1992 | Gatos adultos (10) | NLI: A 2 | 3-4 ganglios | 0,5 mm |
| Yoshida y col. 1993 | Gatos adultos (10) | NLI: A 1 | 6-8 ganglios | 50-200 μ |
| | | NR: A1 | 4-6 ganglios | 5-25 células |
| | | NR: A | 1-3 ganglios | 40-60 μ |
| Shimazaki y col. 1995 | Gatos adultos (5) | NLI: H | 3-4 ganglios | 50-80 células |
| | | NLI: A1 | 3-4 ganglios | 50-80 células |
| | | NR: A1 | 2-3 ganglios | 5-25 células |
| Shimazaki y col. 1995 | Ratas adultas (5) | NLI: H | 1-2 ganglios | 20-45 células |
| | | NLI: A1 | 1-2 ganglios | 20-45 células |
| | | NR: A1 | 3-4 ganglios | 15-30 células |
| Hisa y col. 1996 b | Ratas adultas (11) | NLI: A 1 | 1 ganglio | SP |
| | | NLI P1 | 1 ganglio | SP |
| Nakanishi y col. 1999 | Ratas adultas (20) | NLI: A 1 | 1 ganglio | SP |
| | | NR: A | 1 ganglio | |

TABLA 1.1 Número y localización de los ganglios laríngeos en humanos y diferentes animales de experimentación.

ABREVIATURAS:

NLI-NLE: Bifurcación del nervio laringeo superior interno y nervio laringeo externo.

NLI (nervio laringeo interno):

H-P: bifurcación de las ramas horizontal y posteroinferior a la altura de la membrana tirohioidea. H: sigue la línea media y suministra tres colaterales: S, A1 y A2. S: inerva vallécula y pliegue glosopiglótico. A1: sigue el borde superior del cartílago tiroides. A2: inerva los pliegues ventriculares y ventrículos laringeos. P: discurre por el seno piriforme, da dos ramas. P1: se dirige hacia la cara posterior del cartílago aritenoides. P2: discurre profunda al músculo aritenoides.

NR (nervio recurrente):

A-P: bifurcación de las ramas anterior y posterior por debajo de la articulación cricotiroidea. A: rama intralaringea, penetra por detrás de la articulación cricotiroidea. A1: para el músculo cricoaritenoides posterior. A2: para el músculo interaritenoides. A3: para el músculo cricoaritenoides lateral. A4: para el músculo tiroaritenoides.

SP: Sin Precisar.

La primera descripción realizada de una estructura ganglionar fue realizada en el carnero, donde en el nervio laríngeo superior se halló una estructura ganglionar anexa a sus ramas (Remak, 1840). Posteriormente en los fetos humanos se describió una estructura ganglionar situada en la rama interna del nervio laríngeo superior que seguía la cara interna del borde superior del cartílago tiroideos (Nicolas, 1894; Soulie y Bardier, 1907).

A estos iniciales trabajos se han ido sumando otros realizados bien en animales de experimentación, bien en fetos y adultos humanos que han ido aportando diferentes datos sobre el número y localización de dichas estructuras.

En el perro se han descrito un gran número de ganglios en diferentes localizaciones. En los músculos intrínsecos, cricoaritenideo posterior, cricotiroideo y tiroaritenideo han sido halladas pequeñas agrupaciones de células ganglionares (Geronzi, 1904; Hisa y col 1996 a); en la rama interna del nervio laríngeo superior, bien en su bifurcación después de perforar la membrana tirohioidea (Sugano, 1929; Tanaka y col., 1993 b), bien en las ramas dirigidas hacia la epiglotis (Grynfeldt y Hédon 1907), bien en el espacio paraglótico (Shimazaki y col., 1995; Hisa y col., 1996 c), bien en las ramas dirigidas hacia la parte posterior del repliegue aritenoeplótico (Grynfeldt y Hédon 1907; Hisa y col., 1996 c). También se han descrito estructuras ganglionares asociadas al nervio recurrente en diferentes localizaciones (Masuko y col., 1991), a la altura de su bifurcación en rama anterior y posterior (Sugano, 1929), por debajo del borde inferior del cartílago cricoides (Grynfeldt y Hédon 1907), a nivel de la articulación cricotiroidea (Tanaka y col., 1993 b), en

las ramas para el cricoaritenideo posterior (Lemere, 1932; Shimazaki y col., 1995) y, por último, también se han descrito en el asa de Galeno (Grynfeltt y Hédon, 1907; Sugano, 1929; Lemere, 1932)

En los gatos, al igual que en los perros, también se describieron un diverso número de ganglios. Unos presentes a modo de pequeños grupos de células ganglionares distribuidas en los músculos cricoaritenideo posterior, cricotiroideo y tiroaritenideo (Geronzi, 1904). Otros asociados a la rama interna del nervio laríngeo superior, en la colateral dirigida hacia el ventrículo (Tsuda y col., 1992), en la rama que transcurre por la cara interna del cartílago tiroideo, también conocido como espacio paraglótico (Yoshida y col., 1993). Por último, también han sido descritos ganglios asociados al nervio recurrente a la altura de su bifurcación (Sugano, 1929) y a su entrada en la laringe (Yoshida y col., 1993).

En las ratas como en los otros dos animales de experimentación también se han descrito estructuras ganglionares asociadas a la rama interna del nervio laríngeo superior, en su rama anterior (Shimazaki y col., 1995), inmediatamente medial al cartílago tiroides (Shimazaki y col., 1995; Hisa y col., 1996 b; Nakanishi y col., 1999), cerca de la articulación cricoaritenidea (Hisa y col., 1996 b) así como al nervio recurrente a la altura del músculo cricoaritenideo posterior (Shimazaki y col., 1995; Nakanishi y col., 1999). Además de estos ganglios se han descrito células ganglionares dispersas entre las fibras nerviosas de los nervios laríngeo superior y recurrente (Domeij y col., 1991 a, b, c; Lidegran y col., 1995).

En embriones y fetos humanos se han descrito en la rama interna del nervio laríngeo superior la presencia de dos ganglios el de mayor volumen situado en

la rama anterior dirigida hacia la epiglotis (Grynfeldt y Hédon, 1908; Rubatelli, 1934; Ramaswamy, 1974; Barrios, 1977) y el de menor volumen situado en la rama posterior en relación con el borde apical del cartílago aritenoides (Grynfeldt y Hédon, 1908; Rubatelli 1934). Asociados al nervio recurrente cerca de la articulación cricotiroidea se ha descrito de uno (Grynfeldt y Hédon, 1908; Barrios, 1977) a tres ganglios (Sañudo y Domenech, 1990) de pequeño volumen.

En adultos humanos se describió un ganglio macroscópico, constante, en relación con las ramas del nervio laríngeo superior que se distribuían por el sáculo (Ramaswamy, 1963; Ramaswamy y Kulasekaran, 1974; Ramaswamy y col., 1994). Afifi (1971) describió en laringes adultas un ganglio llamado por él, ganglio epiglótico, que identificaba a ambos lados de la epiglotis al nivel que se correspondía a los apex de los cartílagos aritenoides. Este ganglio estaba situado entre las fibras nerviosas de la rama interna del nervio laríngeo superior dirigidas hacia la parte más inferior de la epiglotis. Este ganglio parece que se pueda corresponder con el descrito por Remak (1840), Nicolas (1894) y Ramaswamy (1963, 1974, 1994).

Como resumen de este apartado podemos decir que en la bibliografía consultada existen discrepancias en relación con el número y la localización de los ganglios laríngeos entre especies y dentro de la misma especie. Las razones de esta diversidad de descripciones pueden ser debidas a razones de tipo técnico, especialmente en los trabajos iniciales, donde las dificultades en la preparación del material (obtención de material humano y realización cortes seriados) y la realización de las tinciones son en algunos casos señaladas por los propios autores (Grynfeldt & Hédon, 1908).

2. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Basándonos en el escaso número de trabajos realizados en material humano sobre los paraganglios o ganglios laríngeos, y a las discrepancias existentes en referencia a su número, localización y naturaleza nos hemos planteado la realización de la presente tesis Doctoral con los siguientes objetivos:

PRIMERO. Determinar el número, posición y morfología de las estructuras ganglionares asociadas a los nervios laríngeos humanos mediante cortes seriados de los mismos.

SEGUNDO. Realizar un estudio inmunohistoquímico utilizando la Cromogranina A (Cr. A), que es una proteína de función desconocida presente en todos los gránulos cromafines (O'Connor y col., 1983; Winkler y col., 1986) para determinar la presencia o no de células neurosecretoras en los ganglios de laringes adultas humanas y con ello inferir si pueden ser considerados poseedores de células paraganglionares.

Se ha seleccionado la Cr. A, porque ha sido utilizado como marcador de células paraganglionares en la vejiga urinaria (Honma, 1994) en la vesícula biliar (Kawabata, 1999) y como marcador tumoral en los diferentes tumores neuroendocrinos laríngeos (Googe y col., 1988; Martínez-Madrigal y col., 1991).

TERCERO. Estudiar la naturaleza de tales estructuras (ganglios/paraganglios) utilizando procedimientos inmunohistoquímicos para determinar el tipo de neurotransmisor utilizado por las mismas. Para ello hemos utilizado la tirosina

hidroxilasa (TH), enzima limitante de la síntesis de catecolaminas, como marcador noradrenérgico y a la acetil colintransferasa (ChAT) como marcador colinérgico.

CUARTO. Estudiar los principales neuromoduladores que se han descrito presentes en estas estructuras nerviosas (VIP, NP-Y, SP y CGRP).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

*"El arte y la ciencia tienen su punto
de contacto en el método"*

Bulwer

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

Se utilizaron dos tipos de muestras y dos tipos de métodos. Las muestras procedentes de necropsias se procesaron para su estudio en microscopia óptica convencional y sirvieron para determinar el número y localización de los ganglios laríngeos. Las muestras procedentes de laringectomías "material fresco" se procesaron para su estudio inmunohistoquímico con el fin de profundizar en la naturaleza de los ganglios laríngeos.

3.1. Microscopía óptica

Los 3 pares de nervios laríngeos, superiores e inferiores o recurrentes, procesados para su estudio convencional por microscopía óptica se obtuvieron de 3 laringes pertenecientes a piezas de necropsias (Tabla 3.1).

| LARINGE (referencia) | EDAD | SEXO |
|-------------------------|------|--------|
| L 1 | 53 | hombre |
| L 2 | 65 | hombre |
| L 3 | 60 | mujer |

Tabla 3.1. Material de necropsia.

3.1.1. Fijación de las laringes.

El proceso de fijación tiene como objeto interrumpir los procesos dinámicos que conducen a la degeneración celular, manteniendo de este modo la estructura de los tejidos con la menor variación posible. En la fijación intervienen una serie de complejas reacciones químicas entre las que son especialmente importantes aquellas que estabilizan las proteínas mediante la formación de enlaces cruzados entre sus moléculas. Estas variaciones en el estado de las proteínas conducen a la inactivación de ciertas enzimas celulares que de otro modo iniciarían la autodigestión y autólisis produciendo la degeneración postmortem. Además la mayor parte de los fijadores son bactericidas, lo que les permite eliminar microorganismos que de otra manera podrían contribuir a causar una eventual destrucción tisular (Geneser, 1987).

Existen varios tipos de fijadores los más utilizados son el formol, el fijador de Bouin y el fijador de Zamboni.

Dado que el objetivo de esta primera parte consistió en determinar la existencia y número de ganglios o agrupaciones de células ganglionares, es decir, de un estudio simplemente anatómico, nos pareció correcto usar como fijador el formol al 10% que además de conservar bien la forma, color y estructura, penetra muy bien en los tejidos incluido los más voluminosos (Woods y Ellis, 1994). El tiempo de fijación estimado como óptimo, fue de 2 meses para cada laringe.

3.1.2. Obtención de las muestras.

Debido a lo costoso en tiempo y dinero del proceso de realización de cortes seriados se consideró más adecuado no procesar la laringe entera y en su lugar proceder a la disección individualizada de cada uno de los nervios hasta su distribución terminal mediante la ayuda de un microscopio quirúrgico Zeiss OPM.3.

En total se obtuvieron 3 pares de nervios laríngeos superiores (derecho/izquierdo) y 3 pares de nervios recurrentes (derecho/izquierdo), lo que hace una muestra total de 6 nervios laríngeos internos, 6 nervios laríngeos externos y 6 nervios recurrentes.

De cada uno de los nervios extraídos se realizó un esquema a tamaño real, sobre papel vegetal, para facilitar su orientación en el proceso de inclusión individualizada de cada uno de los mismos.

3.1.3. Procesamiento de las muestras.

Aunque el tejido adquiere cierta consistencia al ser fijado, esta no es suficiente para permitir el corte del mismo en secciones seriadas y finas. Por tanto, es necesario que el tejido se impregne de un material que al secarse permita el corte. Los materiales empleados con este fin son por lo general sustancias cerosas, como la parafina o la celoidina y se les conoce con el nombre de medios de inclusión (Geneser, 1987).

Para poder incluir cualquier tipo de muestra en parafina es necesario primero una deshidratación total de la muestra, pues la parafina es un material muy hidrófobo. Esta deshidratación se puede realizar de diferentes maneras utilizando alcoholes, gliucoéteres o acetona (Gruber, 1981). Se ha de hacer de forma gradual para evitar desgarros y rupturas de la muestra. El tiempo de este proceso dependerá del tipo y del tamaño de la muestra.

Una vez finalizada la deshidratación la pieza todavía no está preparada para su inclusión en parafina debido a que el alcohol no es capaz de mezclarse con la parafina. Hemos primero de eliminar el exceso de alcohol. Para este proceso utilizamos los llamados líquidos intermedios que son capaces de mezclarse tanto con el alcohol como con la parafina. Los más utilizados son el xilol y el butanol (Gruber, 1981).

En el siguiente protocolo se detallan exactamente los pasos y tiempos empleados durante este proceso.

Protocolo de inclusión del nervio en parafina

1. Lavado de postfijación para eliminar el exceso de fijador.
 - a. Lavados con agua corriente durante 3 horas.
 - b. Lavado durante 1 hora en agua destilada, haciendo cambios durante 15 minutos.
2. Inicio del proceso de deshidratación, sumergiendo el nervio en los diferentes etanoles:
 - a. Etanol 50° durante 30 minutos
 - b. Etanol 70° durante 30 minutos
 - c. Etanol 96° durante 30 minutos
 - d. Etanol de 100°, en este último alcohol se realizan dos cambios de 45 minutos cada uno.
3. Inmersión de la pieza en butanol durante 1 hora y 15 minutos.
 - a. Cambios periódicos cada 30 minutos.
4. Inclusión del nervio en parafina líquida a 35°- 40°, durante un mínimo de 2 horas. Después se realiza un segundo cambio que se deja toda la noche (overnight) y al día siguiente se montan los bloques.

Después de todas de estos tratamientos el nervio ya esta preparado para ser incluido en la parafina.

Existen diferentes tipos de parafina según su punto de fusión. En nuestro caso hemos utilizado una parafina de alto punto de fusión (Histosec de la casa Merk®). Para la obtención del bloque se utilizan piezas metálicas deslizables que se amoldan al tamaño de la pieza, donde se vierte inicialmente una pequeña cantidad de parafina líquida que sirve de base para colocar la pieza, en este caso el nervio. Durante este proceso se realiza la orientación del nervio según el esquema previamente dibujado del mismo de la manera más rápida posible y se continua vertiendo el resto de la parafina. En este momento identificamos la pieza con un número de referencia. Una vez que observamos la formación de una película sólida sobre la superficie se deja enfriar para que se solidifique completamente y sea fácilmente desmontable.

Una vez obtenido el bloque de parafina se recorta ajustándolo al tamaño de la

muestra y ayudándonos de una espátula caliente lo adherimos a una base metálica que facilitará su sujeción al microtomo. Utilizamos un microtomo de rotación marca Leitz®.

Realizamos cortes transversales seriados de 13 micras de espesor. Los cortes se colocaron en portaobjetos previamente tratados con gelatina para asegurar su adhesión a los mismos.

3.1.4. Proceso de tinción del nervio.

Si el corte del tejido está incluido en parafina, debe desparafinarse previamente por medio de un tratamiento con xileno y luego rehidratarse progresivamente utilizando para ello concentraciones decrecientes de alcohol (Gruber, 1981).

La mayoría de los métodos de tinción histológicos se ha desarrollado según sus propiedades de colorear diferencialmente los componentes del tejido o de aumentar el contraste ya existente (Geneser, 1987)

Nosotros hemos empleado la tinción de Hematosina–Eosina (HE) por ser una tinción rápida que permite identificar correctamente la existencia de células en el tejido nervioso, marcando los núcleos de las células de un color azul-violeta y su citoplasma de un color rosado. La coloración de la HE permite pues, observar fundamentalmente la forma y extensión de la célula. En las secciones transversales permite además la identificación de los axones de las fibras nerviosas gracias a su marcada tinción (Gruber, 1981).

Después de la coloración por lo general se realiza una nueva deshidratación y aclaramiento o diafanización del corte, tras lo cual se procede al montaje, es decir, se cubre el corte con una gota de líquido de montaje transparente, en nuestro caso DPX®.

Nosotros para economizar tiempo y dinero en esta fase, seleccionamos portas alternos de forma consecutiva, es decir sólo números pares o sólo números impares, de cada una de las series numeradas para cada nervio y seguimos los pasos detallados en el protocolo adjunto para la tinción de H-E .

Protocolo de la tinción de Hematoxina – Eosina

1. Desparafinado de los portas en xilol: 3 cambios de 10 minutos.
2. Hidratación de la muestra:
 - a. Etanol absoluto: 2 cambios de 5 minutos
 - b. Etanol 96°: 5 minutos
 - c. Etanol 70° : 5 minutos
 - d. Etanol 50°: 5 minutos
 - e. Agua corriente: 5 minutos
3. Teñir con Hematoxilina de Ehrlich durante 1 minuto
4. Lavar con agua corriente el exceso de colorante aproximadamente durante 10 minutos.
5. Contrastar con eosina durante 10 segundos
6. Deshidratar
 - a. Etanol 70°: 5 minutos
 - b. Etanol 96°: 5 minutos
 - c. Etanol absoluto: 2 cambios de 5 minutos
7. Aclarar en xilol: realizar dos cambios de 5 minutos cada uno
Montar los cubres en DPX®.

3.2. INMUNOHISTOQUÍMICA

Los nervios procedentes de laringectomías se obtuvieron después del acto operatorio justo antes de su envío al Departamento de Anatomía Patológica. Todos los nervios procedían de laringectomias totales de pacientes oncológicos tratados en el Servei d'Otorrinolaringologia del Hospital de Sant Pau (Tabla 3. 2).

| REF. | EDAD | SEXO | LOCALIZACIÓN DEL TUMOR | DIAGNÓSTICO (AP) | RDT | QMT | TÉCNICA |
|------|------|-------|-----------------------------------|------------------|-----|-----|---------|
| L-4 | 62 | Varón | Seno piriforme Izq | C. escamoso | No | Si | SF/IFI |
| L-5 | 45 | Varón | Vallécula | C. escamoso | No | Si | SF/IFI |
| L-6 | 54 | Varón | Glotis dch. | C. escamoso | No | Si | SF/IFI |
| L-7 | 70 | Varón | Seno piriforme izq | C. escamoso | No | Si | SF/IFI |
| L-8 | 69 | Varón | Glotis dch. | C. escamoso | No | Si | SF/IFI |
| L-9 | 69 | Varón | Supraglotis dch. | C. escamoso | No | Si | SF |
| L-10 | 59 | Varón | Tumoración dch. | C. escamoso | Si | No | IFI |
| L-11 | 55 | Varón | Comisura anterior | C. escamoso | No | Si | SF |
| L-12 | 57 | Varón | Subglotis | C. escamoso | Si | No | SF |
| L-13 | 57 | Varón | Comisura anterior | C. escamoso | Si | No | SF/IFI |
| L-14 | 76 | Varón | Seno piriforme izq | C. escamoso | NO | SI | IHQ-EP |
| L-15 | 67 | Varón | Comisura anterior | C. escamoso | NO | SI | IHQ-EP |
| L-16 | 46 | Varón | Supraglótica-Base de lengua | C. escamoso | NO | SI | IHQ-EP |
| L-17 | 46 | Varón | Seno piriforme dch | C. escamoso | NO | SI | IHQ-EP |
| L-18 | 75 | Varón | Seno piriforme-base de lengua izq | C. escamoso | NO | NO | IHQ-EP |

Tabla 3.2 Registro de las laringes procedentes de laringectomías realizadas en el Servio d'Otorrinolaringologia del Hospital de Sant Pau y el tipo de técnica que se empleo en el estudio de los nervios laríngeos que se disecaron de las mismas (SF: semifinos;IFI: inmunofluorescencia indirecta; IHQ-EP: inmunohistoquímica enzimática en parafina).

3.2.1. Obtención y número de la muestra quirúrgica

Antes de proceder el cirujano a la laringectomía total quedaban identificados, mediante ligadura, los cabos proximales de los nervios laríngicos. Cuando la exéresis de la laringe había finalizado se retiraba ésta del campo quirúrgico y mediante el uso de un microscopio quirúrgico tipo Zeiss OPM.3, se procedía al seguimiento del nervio hasta donde nos era permitido. Se procuraba incluir como referencias la presencia de los músculos aritenoideo, con el nervio laríngeo interno, y cricoaritenoideo posterior, con los nervios recurrentes (Figuras 3.1 A y B). Los nervios laríngicos se extraían con el tejido celuloadiposo adyacente con el fin de dañarlos lo mínimo posible. Debía tenerse en cuenta el posterior estudio anatomopatológico. En el caso de que el tumor afectase una las áreas de distribución del nervio se desechaba ese lado.

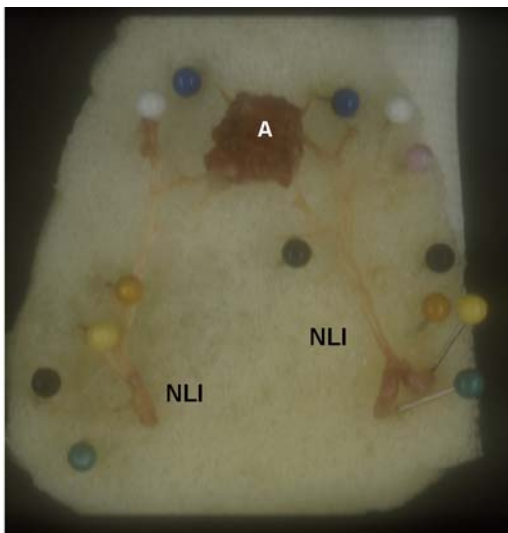


Figura 3.1 A

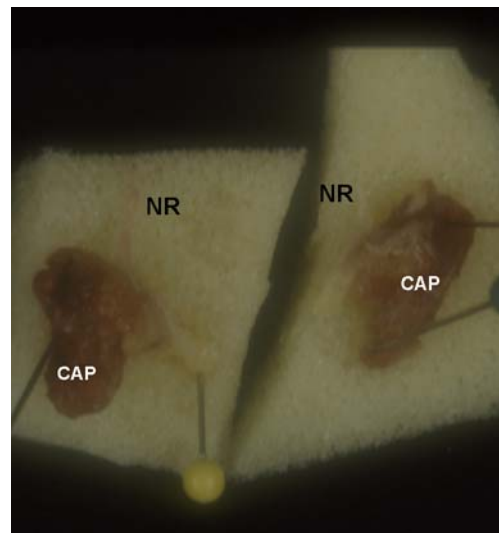


Figura 3.1B

Figura 3.1 A: Imagen del nervio laríngeo interno (NLI) una vez disecado de la pieza quirúrgica, con el músculo aritenoideo (A).

Figura 3.2 B: Imagen del nervio recurrente (NR) una vez disecado de la pieza quirúrgica, con el músculo cricoaritenoideo posterior (CAP).

Las principales ramas colaterales fueron identificadas con alfileres de colores pinchadas en una espuma para mantener al nervio en posición (Figs. 3.1 A y B). Las piezas se trasladaron en cámara fría al laboratorio de la Unidad de Anatomía i Embriología donde se realizaba un estudio minucioso de los segmentos del nervio y se iniciaba su procesamiento.

Del total de las 15 laringes quirúrgicas, no se podía contar en todas ellas con los dos pares de nervios laríngeos debido a que en algunas de ellas la invasión tumoral impedía su aprovechamiento. Inicialmente se destinaron los nervios de las laringes 4 a 14 a la realización de cortes semifinos para el posterior estudio ultraestructural y a cortes por congelación para su posterior estudio por inmunofluorescencia indirecta (Tabla 3.2).

De esas 10 laringes mencionadas (Tabla 3.2) los nervios que se diseccionaron fueron seccionados en segmentos consecutivos de aproximadamente medio centímetro, que previamente se identificaban mediante una referencia. Unos segmentos, se fijaban en tetróxido de osmio al 1% para posteriormente ser incluidos en la resina de EPON y el resto eran conservados en fijador de Zamboni para posteriormente ser procesados para inmunofluorescencia.

En los bloques de EPON seleccionados, los que teóricamente debían de encontrarse los paraganglios y/o ganglios laríngeos superior e inferior, se procedía a realizar cortes semifinos en el ultramicrotomo previa piramidación. Con este procedimiento pretendíamos localizar los paraganglios/ganglios para posteriormente realizar su estudio ultraestructural con microscopio electrónico. Pero todos los intentos fueron infructuosos. Posiblemente, por un lado la técnica utilizada en las primeras disecciones de los nervios que no garantizaba la presencia en ellos de los paraganglios/ganglios y por otro la necesidad de

realizar miles de cortes pudieron ser las causas de la falta de resultados que nos imposibilitó el estudio ultraestructural.

En cuanto a los estudios inmunohistoquímicos primeramente procesamos los pequeños segmentos conservados en Zamboni mediante el empleo de la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Estas muestras después de un corto y sencillo proceso eran cortados en el microtomo de congelación. Esta técnica presentaba dos problemas fundamentales para nuestro trabajo. Primero el gran grosor de los cortes de 140 micras, podría provocar que en un solo corte se fuera todo el área del paraganglio/ganglio y segundo la imposibilidad de asegurar la realización de cortes seriados.

Finalmente, realizamos en las restantes laringes, laringes 15 a 18 (Tabla 3.2), la técnica de inmunohistoquímica en parafina. Esta técnica permite realizar cortes seriados consecutivos y el grosor de los cortes, 13 micras, permite que no se pierda material donde pudiera encontrarse los paraganglios/ganglios. De los pacientes seleccionados para este procedimiento ninguno había recibido radioterapia y todos excepto uno habían recibido quimioterapia (Tabla 3.2).

Como ya hemos comentado anteriormente no en todas las laringes se pudieron diseccionar los cuatro pares de nervios correspondientes (nervios laringeos internos y recurrentes) debido a que la infiltración tumoral hacía imposible su aprovechamiento. La tabla 3.3 recoge el número total de nervios que se destinaron para este estudio.

| L-15 a L-18 | NLI DCH | NLI IZQ | NR DCH | NR IZQ |
|---------------|---------|---------|--------|--------|
| Nº de nervios | 5 | 3 | 4 | 4 |

Tabla 3.3. Registro del número de nervios destinados para el estudio inmunohistoquímico enzimático en parafina procedentes de laringectomías.

Para evitar errores debidos a la curva de aprendizaje inicialmente aplicamos esta técnica a las muestras de nervios laríngeos procedentes de cadáveres fijados en formol al 10 %. Los resultados obtenidos no fueron óptimos, pues encontramos un gran número de falsos positivos y negativos. La explicación a esto es que el formol disminuye o destruye la inmunorreactividad de muchos antígenos tisulares al formar reacciones cruzadas entre sus grupos proteicos terminales alterando de esta forma su estructura primaria y terciaria (Puchtler y Meloan, 1985; Woods y Ellis, 1994).

3.2.2. Procesamiento de las muestras

El fijador utilizado en inmunohistoquímica debe pues lograr además de una buena conservación histológica, conservar la capacidad antigénica así como la accesibilidad del anticuerpo a su lugar de unión específico (Polak y Blooms, 1980; Woods y Ellis, 1994).

El paraformaldehído tamponado es un buen fijador para la inmunohistoquímica y representa el fijador de primera elección para la localización de antígenos caracterizados (Woods y Ellis, 1994).

En nuestro estudio fue el fijador de elección. Los nervios se fijaron en paraformaldehído al 4% tamponado con PB al 0,1 M en un pH 7,4 y se mantuvieron en nevera a 4° durante un mínimo de 2 días y un máximo de 5 días.

El nervio una vez fijado siguió el mismo protocolo de inclusión en parafina, corte seriado con microtomo a 13 μm y subsecuente colocación en los portaobjetos que el descrito para el procedimiento explicado en el apartado de microscopía óptica.

Las técnicas de inmunohistoquímica son técnicas muy complejas y caras que requieren seleccionar de la manera más precisa posible el material que se desea estudiar para evitar el gasto inútil y excesivo de anticuerpos, soluciones y de tiempo. En nuestro caso la selección de los portas que contenían células nerviosas en sus cortes resultó muy laboriosa.

Comenzábamos escogiendo, del total de portas seriados y numerados consecutivamente de cada nervio, uno de cada 10 portas que se teñían con H-E (protocolo expuesto anteriormente, pg. 63). Si el resultado era positivo, es decir, que se localizaban células ganglionares en alguno de los portas seleccionados, se escogían los dos portas consecutivos anteriores y posteriores al porta en cuestión para ser empleados en las técnicas de inmunohistoquímica. Si la tinción de HE resultaba negativa para la identificación de las células nerviosas se procedía a una nueva selección, esta vez cogiendo uno de cada 5 portas y repitiendo el mismo procedimiento.

3.3.3. Técnica de inmunohistoquímica (IHQ)

Los métodos inmunohistoquímicos sirven para detectar antígenos celulares o tisulares mediante reacciones antígeno-anticuerpo.

Para poder visualizar esta unión se utilizan trazadores o marcadores. Este marcaje puede realizarse de diferentes maneras, con fluorocromos, enzimas, iones metálicos coloidales o isótopos reactivos.

Las técnicas de inmunofluorescencia que utilizan como marcadores fluorocromos pueden ser directas o indirectas. En la técnica de inmunofluorescencia directa se utiliza un anticuerpo específico frente al antígeno que se desea detectar, conjugado a un fluorocromo (Figura 3.2)

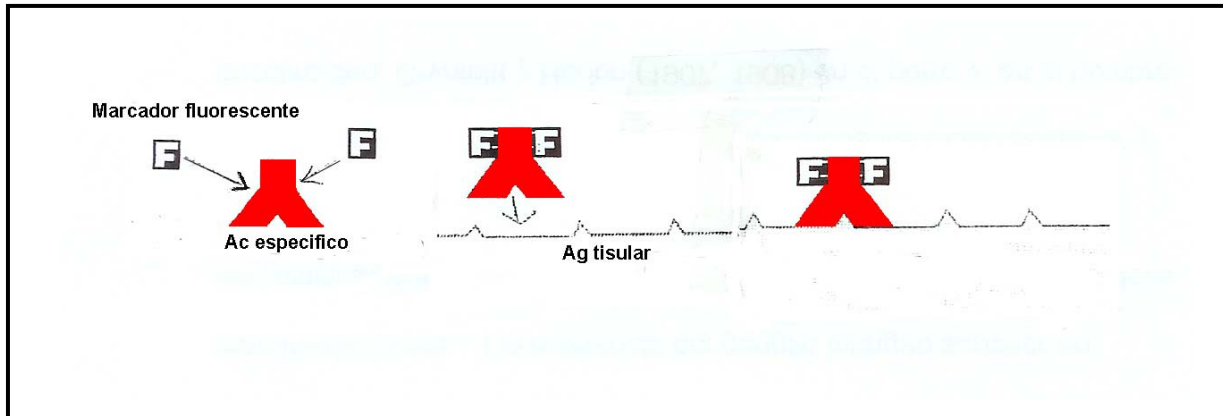


Figura 3.2. Inmunofluorescencia directa

En la técnica de inmunofluorescencia de tipo indirecto, se emplea en un primer paso el anticuerpo específico no marcado y en una segunda fase un anticuerpo marcado con el correspondiente fluorocromo que reacciona de forma específica con el anticuerpo primario (García del Moral, 1993) (Figura 3.3).

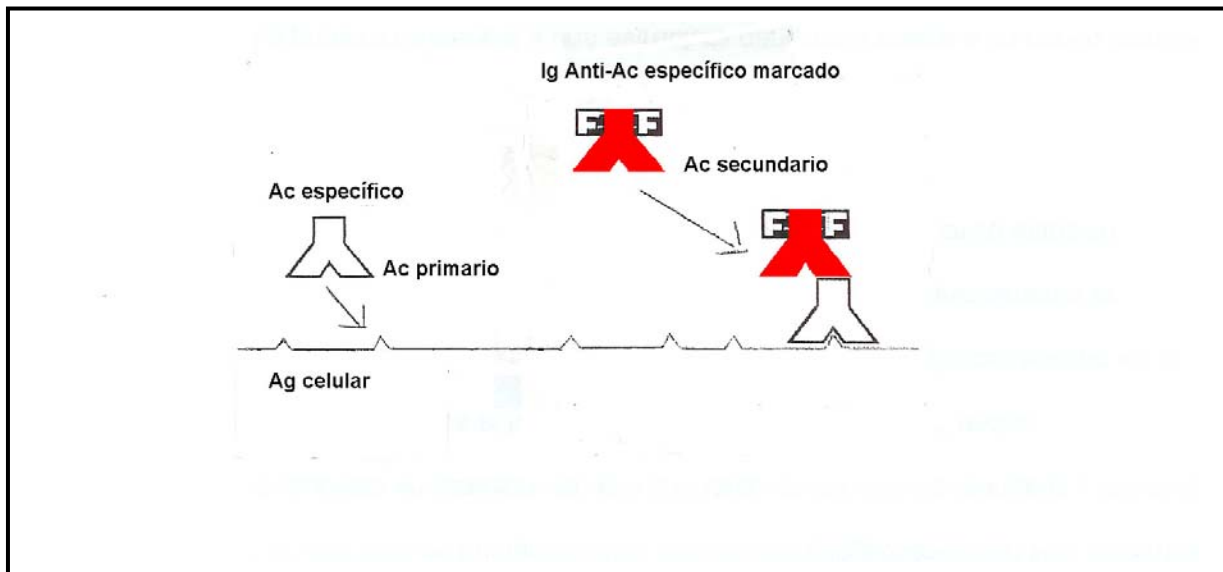


Figura 3.3. Inmunofluorescencia indirecta

La IHQ enzimática, es una técnica de inmunolocalización que utiliza una enzima como trazador del marcaje. En este caso la reacción antígeno-anticuerpo se visualiza añadiendo a final de la reacción el sustrato de la enzima, más una sustancia llamada cromógeno. La reacción de la enzima con el sustrato cromógeno producirá un precipitado de color marrón en el lugar donde está el complejo antígeno-anticuerpo (García del Moral R., 1993).

Nosotros inicialmente utilizamos las técnicas de fluorescencia pero como explicamos anteriormente las abandonamos debido al grosor de los cortes y ante la imposibilidad de realizar cortes seriados. Finalmente realizamos las técnicas de IHQ enzimática que además presentan una serie de ventajas sobre las de inmunofluorescencia:

La primera de las ventajas es que las muestras presentan menos tinción de fondo debido a que no tienen por un lado el inconveniente de la inmunofluorescencia que inducen los grupos aldehídos de las sustancias que se emplean en la fijación del tejido (Falini y Taylor, 1983) y por otro no se produce la adherencia inespecífica de los anticuerpos fluorocromados mediada por receptores Fc de las células linfoides que si se producen en las técnicas de inmunofluorescencia (Serrano y col., 1985). La segunda ventaja es que las preparaciones son permanentes a diferencia de lo que ocurre con la fluorescencia que va desapareciendo con el tiempo. Esto obliga a fotografiar de manera inmediata las muestras porque de lo contrario pierden su positividad. La última ventaja es que no requieren para su visualización de un microscopio de fluorescencia, el cual resulta imprescindible para poder observar el otro tipo de muestras.

De las enzimas utilizadas como marcadores en inmunohistoquímica la más utilizada es la peroxidasa seguida de la fosfatasa alcalina y a gran distancia la glucosa oxidasa (Serrano y col., 1985).

3.3.4 Técnicas de inmunoperoxidasa

La peroxidasa, obtenida del rábano picante, es en la actualidad el marcador enzimático más utilizado. Existen dos tipos de técnicas en función de cómo se utilicen los anticuerpos (García del Moral R., 1993).

Técnicas con anticuerpo marcado

En estos casos la enzima-marcador se une covalentemente al anticuerpo y los procedimientos empleados son estrictamente análogos a los métodos directos e indirectos descritos para la inmunofluorescencia.

Estos procedimientos son sencillos pero también mucho menos sensibles debido a que este tipo de unión puede producir la desnaturalización del anticuerpo y/o de la enzima dejando marcador o anticuerpo libre al final de la preparación (Falini y Taylor, 1983; Serrano y col., 1985).

Técnicas con anticuerpo no marcado

Son procedimientos indirectos que utilizan como trazador inmunocomplejos formados por la enzima peroxidasa y anticuerpos frente a ella, en lugar de anticuerpos marcados. El anticuerpo Ig G antiperoxidasa al ser obtenida del mismo animal que el primario es capaz de reaccionar con el anticuerpo secundario. Este anticuerpo actúa como puente de unión entre el anticuerpo primario y el anticuerpo antiperoxidasa (Figura 3.4). La peroxidasa se añade en el último paso uniéndose a su Ig G específica y finalmente se produce el revelado añadiendo el peróxido de hidrógeno y el correspondiente cromógeno.

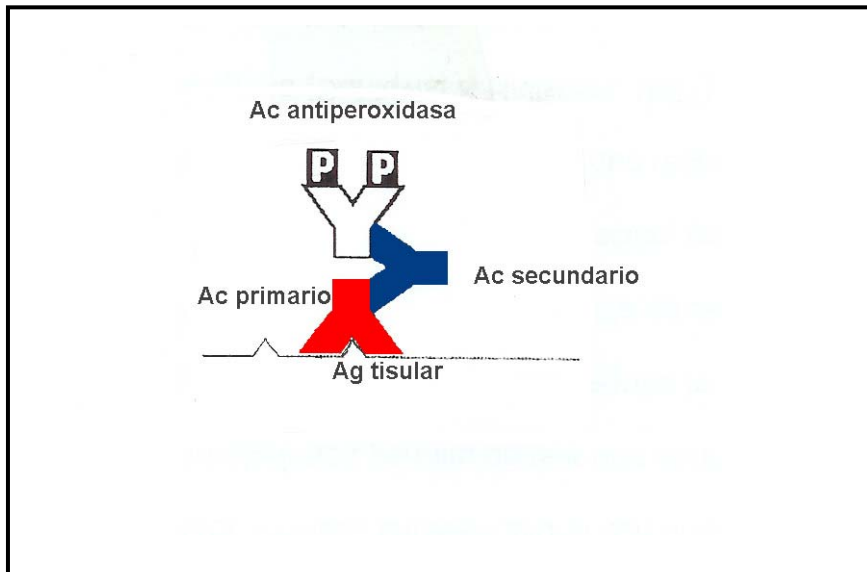


Figura 3.4. Técnica de la peroxidasa

Con objetivo de simplificar esta técnica Sternberger (1970) realizó previamente la unión de la Ig G peroxidasa con la peroxidasa formando el complejo peroxidasa-antiperoxidasa (complejo PAP) a través de una reacción de precipitación . Este complejo es estable y esta formado por tres moléculas de peroxidasa y dos anticuerpo antiperoxidasa (Figura 3.5).

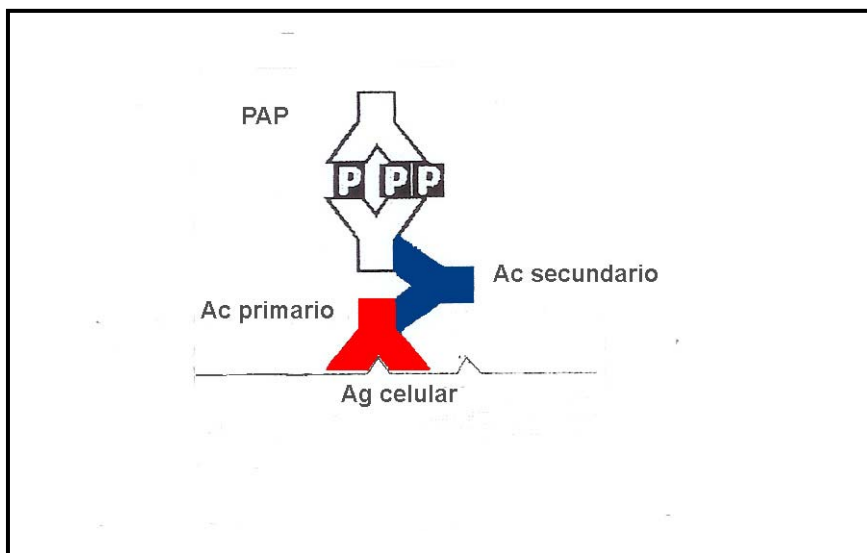


Figura 3.5. Técnica del complejo PAP

A partir de estos métodos de inmunoperoxidasa básicos se han ido desarrollando otras técnicas más específicas y más complejas como las llamadas hapteno-antihapteno, las técnicas de doble marcaje y los métodos que utilizan la afinidad entre determinadas proteínas como paso intermedio para conseguir la unión entre el determinante tisular y el sustrato cromogénico (Falini y Taylor, 1983). De estas últimas la más representativa es el llamado sistema avidina-biotina-peroxidasa.

Sistema avidina-biotina-peroxidasa

La avidina es una glucoproteína de alto peso molecular (60.000 pm). Está presente en la clara de huevo y en la bacteria *Streptomyces avidinii*. Ambas están formadas por cuatro subunidades, que configuran una estructura terciaria con cuatro lugares de unión hidrofóbicos y que posee una alta afinidad para la biotina (Serrano y col., 1985; García del Moral, 1993). Nosotros hemos utilizado avidina procedente de la clara de huevo que es la de más fácil obtención.

La biotina es una pequeña molécula vitamínica perteneciente al complejo B (vitamina H) que se encuentra en la yema de huevo. Se conjuga fácilmente con anticuerpos y enzimas trazadoras por ligarse de manera covalente a cadenas laterales amino o carbonilo de residuos aminoácidos o de azúcares de proteínas y glicoproteínas. Pueden llegar a unirse hasta 150 moléculas de biotina a una sola molécula de anticuerpo (García del Moral, 1993).

Tanto la avidina como la biotina pueden, por tanto, unirse a los anticuerpos y a las moléculas enzimáticas, sin embargo es normalmente la biotina la que se conjuga a estos dos últimos por su menor tamaño (García del Moral 1993).

La unión avidina–biotina no es una unión covalente, su exacta naturaleza se desconoce (Serrano y col., 1985) pero una vez realizada no se afecta por pH externos, solventes orgánicos ni otros agentes desnaturalizantes.

El método avidina-biotina, puede ser aplicado en todas las variantes descritas anteriormente, desde las más simples que utilizan el anticuerpo primario biotinilado a las más habitualmente utilizadas con el anticuerpo secundario biotinilado. En estas últimas se puede añadir la avidina sin marcar para ligar a continuación al complejo formado la enzima biotinilada (método puente avidina-biotina) o bien aplicar el complejo avidina y trazador enzimático biotinilado (ABC-P) que contenga lugares de unión libres en la avidina para que se produzca su unión con el anticuerpo biotinilado (método de complejo avidina-biotina-peroxidasa) (Figura 3.6)

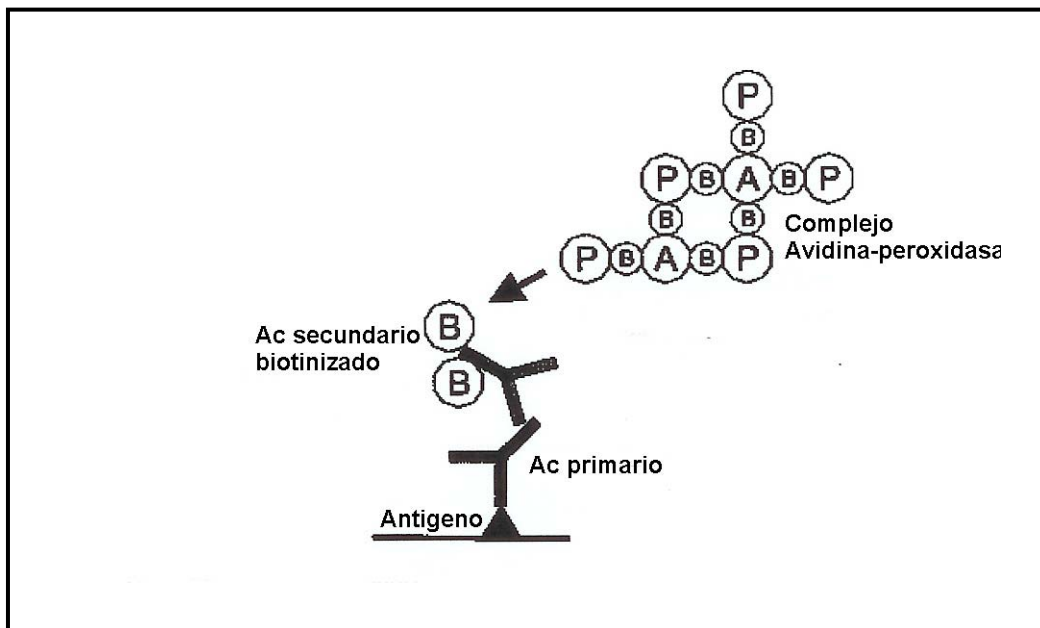


Figura 3.6. Técnica avidina-peroxidasa

El complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABP) propuesto por Hsu y col (1981) es el procedimiento más sensible de los anteriores. Tiene mayor afinidad por los reactivos, lo cual permite utilizar una mayor dilución del Ac biotinilado y una mayor sensibilidad ya que su menor tamaño facilita su acceso a los lugares antigénicos y permite formar complejos altamente ramificados en cada lugar antigénico.

Para poder visualizar el complejo ABP es necesario añadirle el sustrato enzimático junto al cromógeno. A este proceso se le conoce con el nombre de revelado. Los cromógenos más utilizados son la diaminobencidina (DAB), el 3-amino-9-etil-carbazol, el 4-Cloro-naftol, el reactivo de Hanker-Yates, etc. Por lo común con la DAB se obtienen resultados óptimos y permitir aumentar la intensidad de la tinción añadiendo al final metales pesados (Serrano y col., 1985; Garcia del Moral, 1993).

De los diferentes métodos expuestos de IHQ enzimática seleccionamos para nuestro estudio el que emplea el sistema del complejo avidina-biotina-peroxidasa por tratarse de una técnica muy sensible y factible de realizar sobre cortes de parafina. Usamos como sustrato enzimático el peróxido de hidrógeno al 3% y como cromógeno la Diaminobencidina (DAB). Los pasos detallados de la realización de este proceso se encuentran en la sección de protocolos de actuación en inmunohistoquímica (pg. 89).

Aspectos técnicos de la IHQ enzimática

Las condiciones en las que se desarrolla la fijación repercuten de manera muy importante en el resultado de las técnicas de inmunohistoquímica. No sólo el tipo de fijador utilizado como ya hemos mencionado anteriormente sino también el tiempo de fijación que ha de ser el suficiente para que se preserve la imagen histológica pero sin que este sea excesivo porque sino se reduce la inmunorreactividad del tejido (García del Moral, 1993).

La pérdida de la inmunorreactividad de las muestras fijadas en exceso es debido a la formación de enlaces entre las proteínas inducidos por el formaldehído, enmascarando los epítopos o lugares antigénicos

Existen diferentes sistemas para la recuperación antigénica. Entre ellos están el tratamiento con enzimas proteolíticas como la tripsina, pepsina o papaina y la recuperación antigénica basada en el calor que bien puede realizarse en una olla a presión o bien mediante la irradiación en microondas.

Comparando los métodos anteriores, los mejores resultados se han obtenido mediante la recuperación antigénica basada en el calor (Shi y col., 1991; McQuaid y col., 1995; Pileri y col., 1997). No se han encontrado diferencias significativas entre el uso de la olla a presión y el microondas (Pileri y col., 1997).

El mecanismo por el cual esta técnica es efectiva para el desenmascaramiento no está del todo esclarecida aunque lo más probable es que el calor y la hidrólisis puedan desnaturalizar y romper las proteínas del tejido en o cerca de los puentes hechos por la formalina entre las cadenas de aminoácidos adyacentes. Las desdobladas cadenas de proteínas permitirían la subsecuente

restauración de los lugares antigénicos que aparecerían cuando se dejan enfriar (Cattoretti y Suurmeijer, 1995).

El uso de microondas o la olla a presión además de permitir la recuperación de muchos de los antígenos que quedan enmascarados por el uso del formaldehído (Shi y col., 1991; Pileri y col., 1997) permite acortar los tiempos en la realización de la IHQ (Van de Kant y col., 1988), mejorar los resultados de las técnicas, reducir la tinción de fondo y permite trabajar con diluciones más bajas (Pileri y col., 1997). Sin embargo, las condiciones utilizadas en el microondas han de ser bien controladas pues una excesiva potencia o unos tiempos de exposición demasiado largos pueden causar una interrupción de los cortes con alteración de la morfología de las muestras (McQuaid y col., 1995).

Con el deseo de comprobar si se mejoraban los resultados obtenidos y se producía algún desenmascaramiento de los antígenos estudiados realizamos en varias series un desenmascaramiento en microondas modificando ligeramente el protocolo propuesto por la casa comercial de Chemicon International^R variando los tiempos de exposición hasta que se lograron los resultados más óptimos (Ver protocolo de actuación en inmunohistoquímica en la pg.90).

Otro de los problemas con el que nos encontramos en estas técnicas es que debemos asegurar la especificidad de la reacción, es decir, eliminar al máximo todos los falsos positivos. Debemos por tanto evitar que exista una intensa tinción de fondo y realizar un test de especificidad que nos verifique que las reacciones obtenidas son realmente positivas.

En nuestra técnica una tinción de fondo excesiva puede ser debida a una actividad enzimática endógena y la posibilidad de uniones inespecíficas endógenas.

Cuando en las técnicas inmunoenzimáticas se utiliza como marcador una enzima normalmente presente en el tejido que se examina, debe realizarse una inhibición de su actividad endógena antes de la inmunotinción, sino la enzima endógena reaccionará con el sustrato empleado para localizar la enzima marcadora, originando un falso positivo (García del Moral, 1993).

En este caso la actividad de la peroxidasa se halla en los hematies y granulocitos presentes en las muestras extraídas. Además la peroxidasa endógena, citocromo oxidasa y catalasa pueden reaccionar con el peróxido de hidrógeno y reducir la DAB originando una tinción inespecífica y por tanto es necesario realizar un bloqueo de la peroxidasa endógena como incluimos en nuestro protocolo (Paso 3 del protocolo sistema avidina-biotina-peroxidasa). Existen diferentes métodos para realizar este bloqueo, se puede realizar con fenilhidracina, ázida sódica o peróxido de hidrogeno. En nuestro caso se realizó con peróxido de hidrogeno (agua oxigenada) al 3%.

Existen tejidos que tienden a mostrar una tinción de fondo inespecífica por uniones hidrofóbicas e interacciones iónicas, especialmente ocurre en el tejido conectivo, epitelio y tejido adiposo. Para evitar este punto se utilizan detergentes no iónicos como el Tritón X-100 y proteínas inertes como la gelatina de pescado, la albúmina sérica bovina que actúan compitiendo por los lugares de unión disminuyendo de esta manera la absorción no específica.

En nuestras preparaciones utilizamos el Tritón X-100 y el suero bovino fetal (Fetal Calf Serum, FCS).

A pesar de haber reducido al máximo la tinción de fondo debe realizarse un test de especificidad. Es lo que se denomina controles de positividad. Estos controles se realizan en una muestra de tejido en el que sabemos que existe una gran cantidad del antígeno que nos interesa.

El objetivo que perseguíamos con esta técnica era determinar la naturaleza autonómica o paraganglionar de estas estructuras ganglionares o lo que es lo mismo determinar la existencia o no de células neurosecretoras en su interior. Por tanto, seleccionamos para realizar los controles de positividad sobre esta particularidad a la médula suprarrenal de rata donde sabemos que en el citoplasma de sus numerosas células cromafines se encuentra presente la Cromogranina A (figura 3.7). Como controles de los neurotransmisores TH y ChAT (figuras 3.8 y 3.9) y de los neuropeptidos VIP y NP-Y (figuras 3.10 y 3.11) se utilizó el cortex cerebral de rata donde han sido descrita su presencia y como control para los neuropéptidos CGRP y SP se utilizó la médula espinal de rata (figuras 3.12 y 3.13).

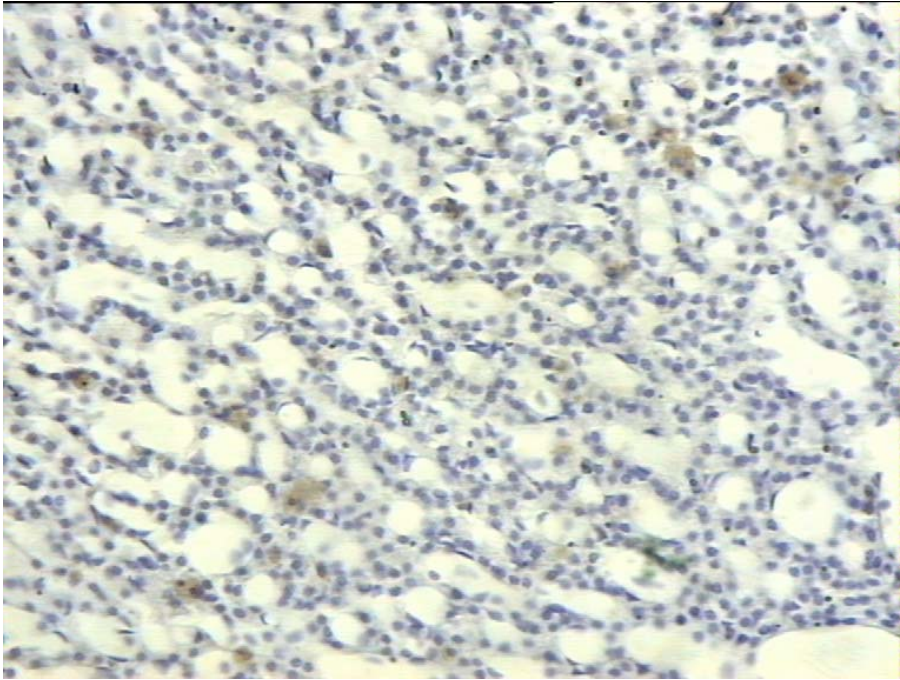


Figura 3.7. Cromogranina A. Control de positividad (x40). Células cromafines de la medula adrenal de rata inmunorreactivas para la cromogranina A. Técnica de A-B-P y contratinción con hematoxilina de Ehrich.

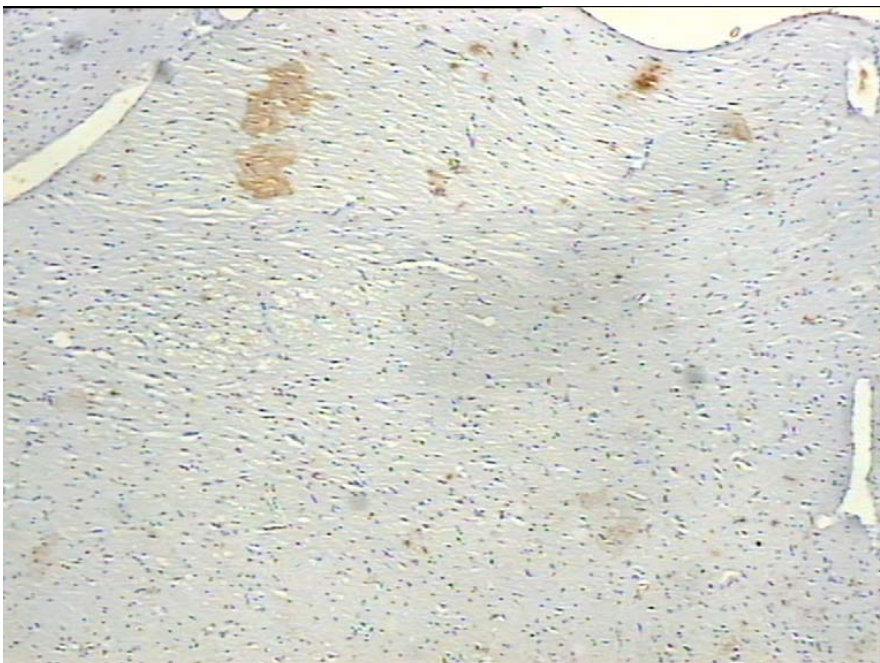


Figura 3.8. Tiroxina Hidroxilasa (TH). Control de positividad (x40). Células nerviosas del cortex cerebral de rata inmunorreactivas para la TH. Técnica de A-B-P y contratinción con hematoxilina de Ehrich.

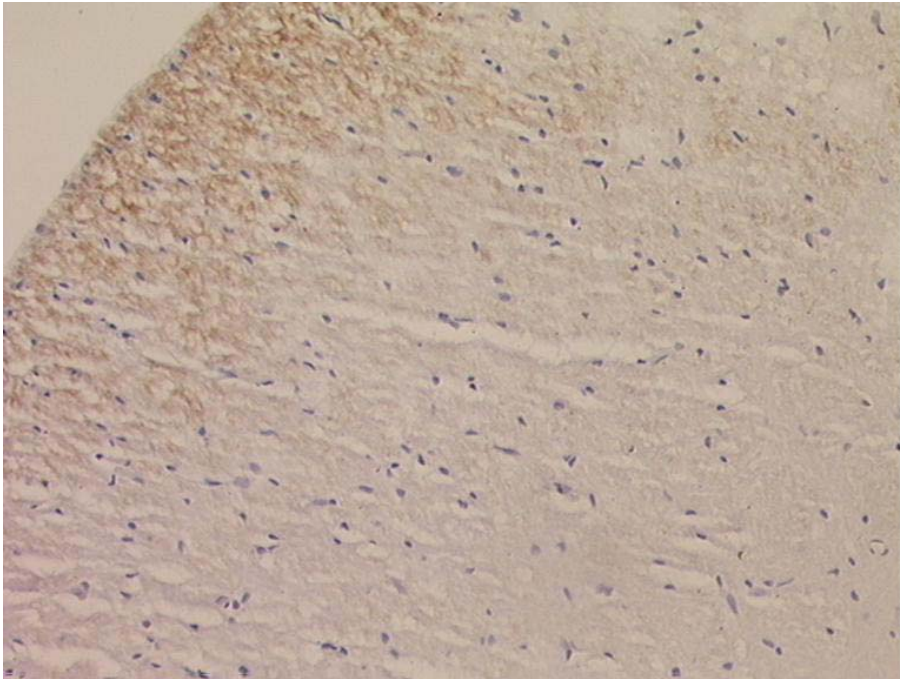


Figura 3.9. Colina Acetil Transferasa (ChAT) Control de positividad (x40). Células nerviosas del cortex cerebral de rata inmunorreactivas para la ChAT. Técnica de A-B-P y contratinción con hematoxilina de Ehrich.

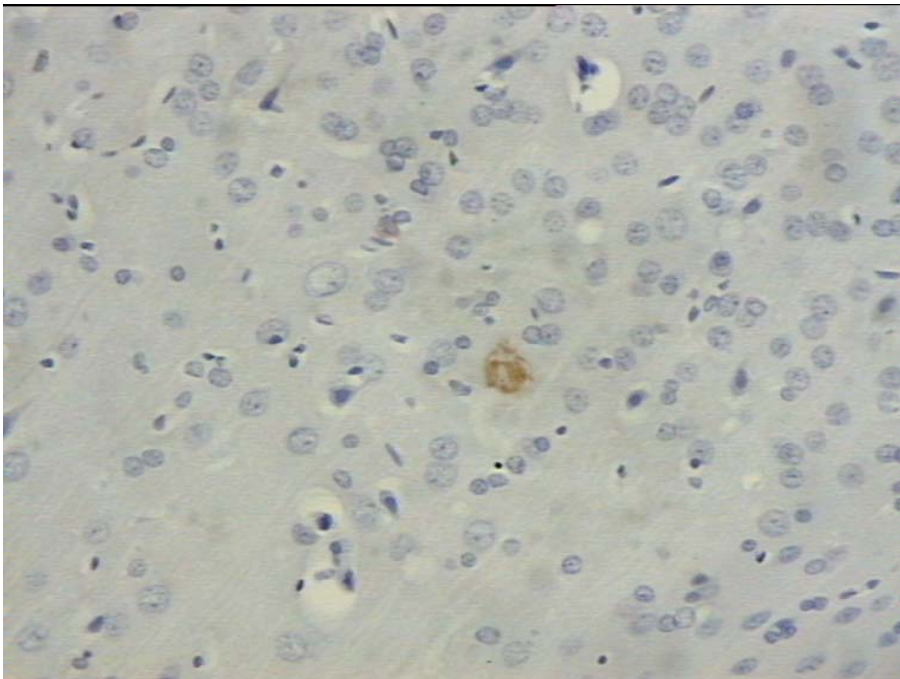


Figura 3.10. VIP. Control de positividad (x40). Célula nerviosa del cortex cerebral de rata inmunorreactivas para el VIP. Técnica de A-B-P y contratinción con hematoxilina de Ehrich



Figura 3.11. NP-Y. Control de positividad (x10). Célula nerviosa del cortex cerebral de rata inmunorreactivas para el VIP. Técnica de A-B-P y contratinción con hematoxilina de Ehrlich.



Figura 3.12. SP Control de positividad (x4). Aparece inmunorreactividad en los cordones posteriores de la médula espinal de rata. Técnica de A-B-P y contratinción con hematoxilina de Ehrlich.

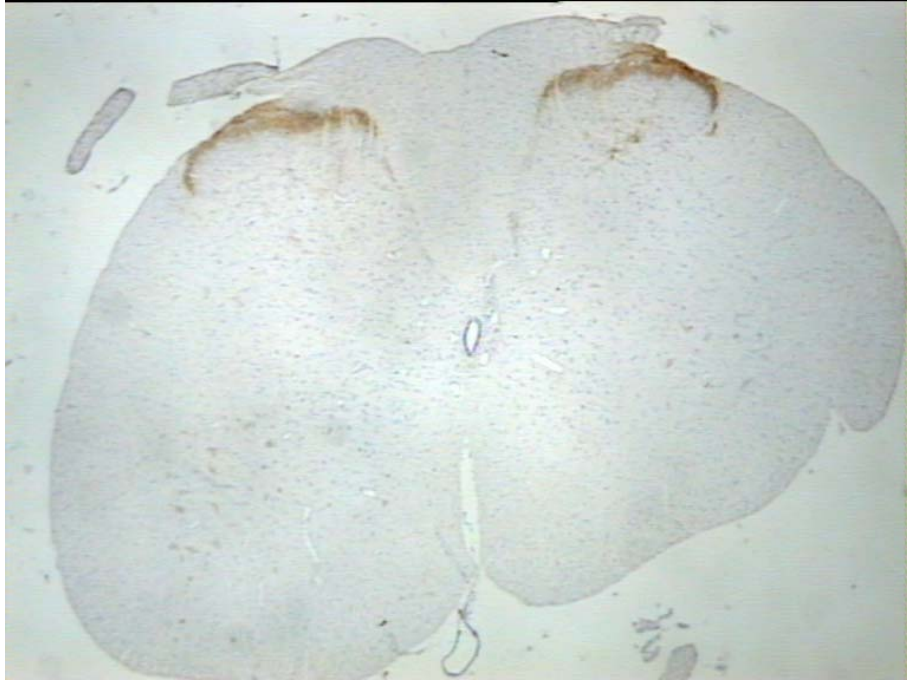


Figura 3.13. CGRP Control de positividad (x4). Aparece inmunorreactividad en los cordones posteriores de la médula espinal de rata. Técnica de A-B-P y contratinción con hematoxilina de Ehrlich.

Por último, durante la fase de revelado hemos de tener en cuenta que el incremento o disminución en la proporción entre cromógeno (DAB) y sustrato (peróxido de hidrógeno) así como una exposición excesiva a la luz pueden aumentar el efecto oxidante afectando al grado de tinción específica y de esta manera aumentar el fondo de la reacción final. Por tal motivo se recomienda que el revelado se realice en condiciones de iluminación no muy intensa y que el agua oxigenada (peróxido de hidrógeno) no exceda la concentración del 3 por 100 y la de DAB la de 0,5 por 100.

Para manipular la DAB es preciso adoptar ciertas precauciones dado su efecto carcinogénico, debe ser manejada bajo campana de gases y usando guantes y mascarilla.

Protocolo para el sistema avidina-biotina peroxidasa

1. Desparafinar (3 cambios de 10 minutos en xilol)
2. Hidratar
 - a. Alcohol absoluto: dos cambios de 10 minutos cada uno
 - b. Alcohol 96°: 5 minutos
 - c. Alcohol 70°: 5 minutos
 - d. Alcohol 50°: 5 minutos
 - e. Agua corriente : 5 minutos
3. Lavar en tampón TBS 0,05 M, pH 7,2 (durante 10 minutos)
4. Inhibición de la actividad peroxidasa endógena (durante 30 minutos) en 3% de agua oxigenada en 80% metanol en TBS.
5. Lavados en TBS + 0,1 % de Tritón X-100 (3 cambios de 10 minutos).
6. Bloqueo de las uniones inespecíficas con 10% FCS en TBS + 0,1% de Tritón X-100 (20 minutos).
7. Decantar el FCS e incubar con el Ac primario: diluido en 10% FCS en TBS + 0,1 % de Tritón X-100 (toda la noche a 4° en cámara húmeda + 1 hora a temperatura ambiente)
8. Lavados en TBS + 0,1 % de Tritón X-100 (3 cambios de 10 min)
9. Incubación con el Ac secundario biotinado: diluido 1:200 en 10% FCS en TBS + 0,1 % de Tritón X-100 (1 hora y media)
10. Lavados en TBS + 0,1 % de Tritón X-100 (3 cambios de 10 min)
11. Incubar con avidina-peroxidasa diluido 1:400 en 10% FCS en TBS + 0,1 % de Tritón X-100 (1 hora y media).
12. Lavado en TBS + 0,1 % de Tritón X-100 (2 cambios de 5 min)
13. Lavado en TBS (1cambio de 5 min)
14. Lavado en TB (1cambio de 5 min)
15. Revelado de la peroxidasa con el DAB durante 6 min y 30 s. Preparado de la siguiente manera

| | |
|----------------|-------|
| DAB | 100mg |
| TB | 200ml |
| Agua oxigenada | 60ul |
16. Lavado en TB (3 cambios de 5 min)
17. Lavar en agua corriente durante 5 min.
18. Deshidratar, aclarar y montar.

Contraste opcional de nucleos o contratinción

Permite identificar mucho mejor las diferentes estructuras tisulares. Se realiza antes de pasar al proceso de deshidratación y montaje de las preparaciones para su consevación definitiva.

1. Lavado en agua destilada (3 min)
2. Contrastado en Hematoxilina de Ehrich (30 segundos).
3. Lavado en agua corriente (10 min)
4. Deshidratar
 - a. Etanol 30°: 5 minutos
 - b. Etanol 50°: 5 minutos
 - c. Etanol 70°: 5 minutos
 - d. Etanol absolutos: 2 cambios de 10 minutos
5. Aclarar en xilol: realizar dos cambios de 10 minutos
6. Montar con DPX

Protocolo para el sistema avidina-biotina peroxidasa utilizando microondas

1. Desparafinar (3 cambios de 10 minutos en xilol) e hidratar (concentraciones decrecientes de etanol).
2. Lavar en tampón TBS 0,05 M, pH 7,2 (durante 10 minutos)
3. Desenmascaramiento de antígeno en microondas. Se colocan los portas en una cestilla y esta se introduce en una cubeta a la que se añade una solución de 300 ml de TBS hasta que los portas quedan completamente cubiertos.
4. Se introduce en el microondas a potencia máxima durante 2 minutos
5. Se extrae y se deja enfriar durante 1 minuto
6. Se introduce de nuevo en el microondas a potencia máxima durante 1 minuto.
7. Se deja enfriar 15 minutos
8. Se realiza un lavado durante 5 minutos en TBS y se continua el protocolo para la avidina biotina peroxidasa.

Anticuerpos o antisueros

Existen dos tipos de anticuerpos, monoclonales y policlonales. Estos últimos son los más frecuentemente utilizados, resultan de una mezcla de anticuerpos de alta afinidad de los cuales cada uno es activo para un diferente epitopo del antígeno. Los anticuerpos monoclonales son mucho más caros y son una preparación pura de un anticuerpo que reconoce exclusivamente un epitopo del antígeno.

Para una tinción óptima es necesario que cada anticuerpo se utilice en la dilución más adecuada, evitando que se evapore durante la incubación, y eliminando al completo la cantidad de anticuerpo no unido al antígeno antes de la siguiente incubación. Diluciones inadecuadas pueden originar falsos negativos e incrementos en la tinción de fondo (García del Moral, 1993).

Las incubaciones se han de realizar en atmósferas húmedas, preferentemente en cámaras frigoríficas para evitar la evaporación de los anticuerpos. La temperatura influye en la velocidad de reacción antígeno-anticuerpo, por tanto, incubaciones cortas se harán a temperatura ambiente e incubaciones largas en cámaras de incubación a temperatura de 4 grados.

Es imprescindible eliminar todo el exceso de antisuero de una incubación antes de pasar al siguiente paso. Para ello se realizan lavados con tampones el más utilizado es el TBS. Para que el lavado sea más óptimo es necesario que el tampón se agite continuamente sobre la superficie del corte, para ello se colocan los portaobjetos sobre un agitador mecánico o en un baño de agitación al vacío.

Antisueros primarios utilizados

CHROMOGRANIN A, antisuero de Serotec (nº C MCA 845H), anticuerpo monoclonal de raton (dilución 1/2)

TIROSINA HIDROXILASA (TH), antisuero de Santa Cruz Biotechnology (nº C TH C-20 sc-7847), anticuerpo policlonal de cabra (dilución 1/100)

CHOLINE-ACETILTRANSFERASA (ChAT), antisuero de Chemicon (nº C ABP 144P-200UL), anticuerpo policlonal de cabra (dilución 1/100)

VASOACTIVE INTESTINAL PEPTIDE (VIP), antisuero de Dia Sorin (nº C 20077), anticuerpo policlonal de conejo (dilución 1/100)

NEUROPEPTIDO Y (NP-Y), antisuero de Dia Sorin (nº C 22940), anticuerpo policlonal de conejo (dilución 1/100)

SUSTANCIA P (SP) antisuero de Dia Sorin (nº C 20064), anticuerpo policlonal de conejo (dilución 1/100)

CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE (CGRP) antisuero de Dia Sorin (nº C 24112), anticuerpo policlonal de conejo (dilución 1/100)

Anticuerpos secundarios utilizados

ANTICUERPO ANTI-RATON BIOTINADO, antisuero de Amersham (nº C RPN 1001), anticuerpo secundario policlonal frente a ratón conjugado con biotina (dilución 1/200)

ANTICUERPO ANTI-CABRA, antisuero de Amersham (nº C. RPN 1025), anticuerpo secundario policlonal frente a cabra (dilución 1/200)

ANTICUERPO ANTI-CONEJO, antisuero de Amersham (nº C..RPN 1004), anticuerpo secundario policlonal frente a conejo (dilución 1/200)

COMPLEJO AVIDINA –PEROXIDASA de la casa DAKO (nº C P0364) (Dilución 1/400).

Soluciones empleadas

Fijador de paraformaldehído al 4% en PB (0,1 m, pH 7.4)

Para preparar 1000 ml.:

SOLUCIÓN A

Mezclar en 400 ml de agua destilada:

35,81 gr Na_2HPO_4 + 12 ml H_2O

8 gr NaCl

Completar hasta 500 ml con agua destilada. Llevar el pH hasta 7.40 añadiendo gotas de HCl. Conservar a 4°.

SOLUCIÓN B

Poner a calentar 500 ml de agua destilada, cuando alcance los 60° se añaden 40 gr de paraformaldehído. En continua agitación se añaden unas gotas de 2,5% NaOH hasta que la solución sea completamente transparente. Finalmente se filtra y se deja enfriar.

SOLUCIÓN FINAL

Mezclar las soluciones A y B

El agua destilada utilizada será preferentemente de la calidad Mili-Q

Solución de tampón TBS 0.05 m pH 7.2

Para preparar 2 litros:

12,11 gr de Trizma base (Tris-hydroxymethyl-aminomethano)

17.53 gr de NaCl

2 litros de agua destilada

6,8 ml de ClH

Ajustar pH hasta 7.2