

## **4. RESULTADOS**

*¿"Que es lo más difícil?  
Lo que parece más fácil;  
ver con los ojos  
lo que está delante de ellos*

Goethe

#### 4. RESULTADOS

Antes de exponer el número y localización topográfica precisa de los ganglios laríngeos se hace necesario describir la distibución intralaríngea de los nervios a los que están asociados.

La terminología y descripción realizada a continuación sobre el trayecto y colaterales de los nervios laríngeos se basa en el trabajo, ya clásico, de Dilworth (1921). En la descripción de los nervios laríngeos no figura la de la rama externa del nervio laríngeo superior, porque en ella no observamos ninguna estructura ganglionar anexa, a diferencia de lo observado en la rama interna del nervio laríngeo superior y del nervio recurrente.

Seguidamente a estas descripciones pasamos a exponer los resultados obtenidos en el proceso de inmunohistoquímica para la cromogranina A, tirosina hidroxilasa, acetilcolina transferasa, VIP, NP-Y, Sp y CGRP.

#### 4. 1. Distribución del Nervio laríngeo interno (NLI).

En todo el material estudiado el NLI una vez que sobrepasa el nivel de la membrana tirohioidea se divide en dos ramas terminales: una horizontal y otra posteroinferior. No existiendo diferencias estadísticamente significativas en relación con su distribución por lado.

La rama horizontal, se dirige hacia la linea media formando un haz de finos filamentos, Dilwoth (1921) los describe subdividido en cuatro ramas, que secundariamente se subdividirán en ramas más pequeñas. Nuestros resultados muestran esta rama horizontal subdividida en dos ramas principales con sus consiguientes ramificaciones, a las que hemos llamado rama superior (S) y rama anterior (A) haciendo referencia a la dirección del trayecto de sus ramas.

La primera rama (S), se dirige cranealmente para inervar la mucosa de la vallécula y pliegue glosoepiglótico (Figura 4.1).

La segunda rama (A), sigue el trayecto horizontal del tronco principal y se subdivide en dos ramas (A1 y A2). La rama A1 es paralela al borde superior del cartílago tiroides y se distribuye por el vestíbulo laríngeo. En tres casos La rama A1 se subdividía para volver de nuevo a conectarse formando un ojal entre las dos ramas de división (Figura 4.1).

La rama A2, se dirige hacia abajo y hacia delante, hacia el músculo tiroaritenoideo, distribuyéndose por la región del vestíbulo relacionada con los pliegues ventriculares y ventrículos laríngeos (Figura 4.1). En tres de los especímenes, la rama A2 , se origina a partir de la rama A1.

En todos los casos hemos observado que a lo largo de su trayecto las ramas A1 y A2, presentan numerosas conexiones entre ellas, dando una imagen similar a la de un plexo nervioso (Figura 4.1).

La rama posteroinferior (P), transita por el seno piriforme y se divide en dos ramas terminales P1 y P2 (Figura 4.1).

La primera de ellas, la rama P1, se dirige hacia la zona posterior del pliegue aritenoepiglótico para acabar distribuyéndose en la cara posterior de cartílago aritenoides (Figura 4.1).

La rama P2, perfora al músculo aritenoideo y se distribuye por la comisura posterior de la laringe. Esta rama también suministra pequeños ramos colaterales que se pierden entre las fibras del músculo aritenoideo (Figura 4.1).

Al igual que en el caso de las ramas A1 y A2, entre las ramas P1 y P2, también hemos encontrado numerosas conexiones entre ambas (Figura 4.1).

Esta descripción guarda cierto paralelismo con la realizada por Stephens y colaboradores en 1999, quienes describieron a la rama interna del nervio laringeo superior dividida en tres ramas terminales principales: superior, que se corresponde con la denominada por nosotros rama S, media, que equivaldría a la rama A y por último, la rama inferior que se correspondería con nuestra rama P.

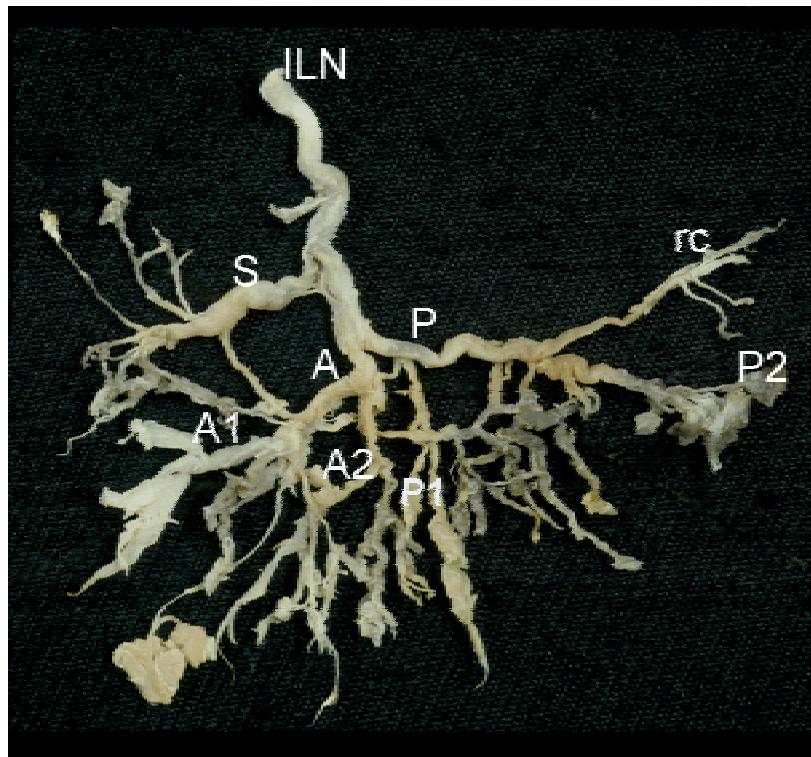


Figura 4.1. Visión del NLI con sus ramas de división principales (S, A y P) y sus subsecuentes ramificaciones y anastomosis. S, rama que se distribuye por la vallécula y pliegue glosoepiglótico. A, rama de trayecto horizontal que se a su vez se subdivide en dos ramas: A1, que se distribuye por el vestíbulo laringeo y A2, que se dirige hacia el músculo tiroaritenoideo. P, rama que transita por el seno piriforme y se une con la homónima del nervio recurrente para formar la denominada Asa de Galeno (rc). Las ramas P1 y P2 son colaterales de la rama posterior P. P1, se dirige hacia la cara posterior del cartílago aritenoides y P2, transita profunda al músculo aritenoideo.

#### 4.1.1. Ganglios: número y localización.

En cada NLI hemos observado de 3 a 4 ganglios (Tabla 4.1).

MATERIAL	LOCALIZACIÓN	NÚMERO	TAMAÑO
Adultos humanos (n=3)	NLI: A1	1 ganglio constante 2-3 adicionales inconstantes	0,1-0,3 mm
	NLI: P1	1 ganglio constante	10-50 um
	NLI: S	1 ganglio inconstante	10-14 células
	NLI: P2	1 ganglio inconstante	3-4 células

Tabla 4.1. Número y localización de los ganglios asociados al NLI

S: rama que se distribuye por vallécula y pliegue glosoepiglótico. A1: rama que se distribuye por el vestíbulo laríngeo. P1: rama que se dirige hacia la cara posterior del cartílago aritenoideo. P2: rama para el músculo aritenoideo.

El ganglio de mayor volumen observado se localiza en la rama A1, a una distancia de entre 1cm a 1,5 cm (media de 1,3) del origen del nervio. Este ganglio está presente en todos los nervios estudiados (Tabla 4.1) y su tamaño oscila entre 0,1-0,3 mm de altura. Esta formación ganglionar no aparece encapsulada sino distribuida como un reguero celular que se extienden a lo largo del recorrido inicial del nervio (Figura 4.2.a y b). Está formado por varios centenares de células principales de gran tamaño, forma poligonal, núcleo central y citoplasma basófilo, rodeadas por células satélites de menor tamaño e intensamente basófilas. Ambos tipos de células se encuentran dispersas entre las fibras nerviosas (Figura 4.2.c y d).

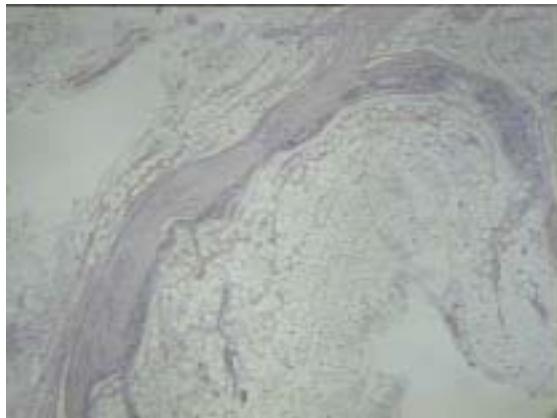


Figura 4.2.a.

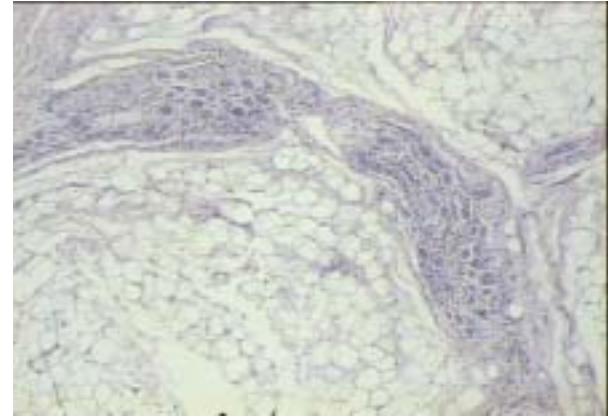


Figura 4.2.b.

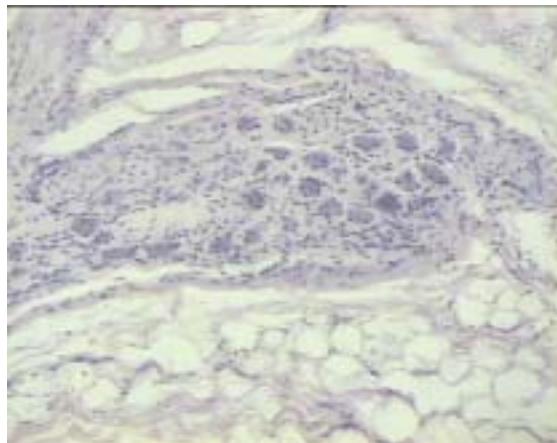


Figura 4.2.c.

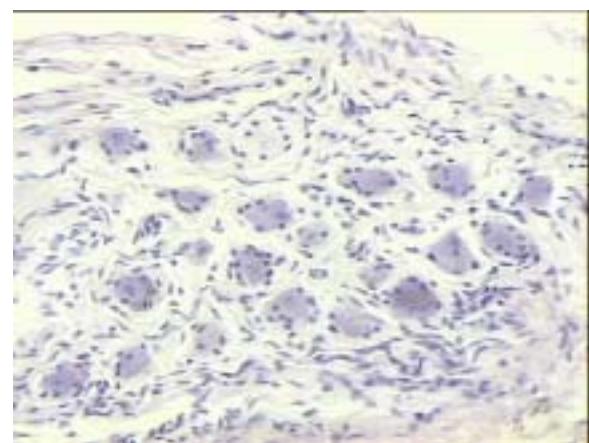
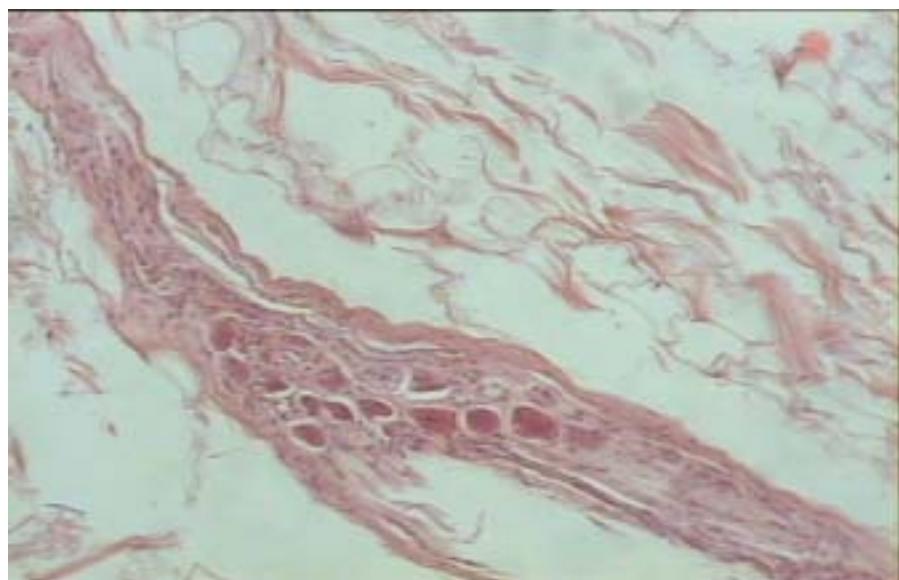


Figura 4.2.d.

**Figura 4.2. (a-d).** Ganglio asociado a la rama A1 del NLI, Tinción de H-E. **4.2.a (X4)**, Imagen panorámica de la distribución adoptada por las células nerviosas a modo de regueros celulares entre las fibras nerviosas. **4.2.b (X10)**, la foto muestra a mayor detalle la gran celularidad que presenta este ganglio. **4.2.c (X20)**, detalle donde se puede observar la ausencia de cápsula y la situación de las células entre las fibras nerviosas. **4.2.d (X40)**, detalle para mostrar la morfología poligonal de las células de mayor tamaño, con citoplasma basófilo pálido, y de las células que las rodean, de menor tamaño e intensamente basófilas. También se observa una gran cantidad de fibras nerviosas.

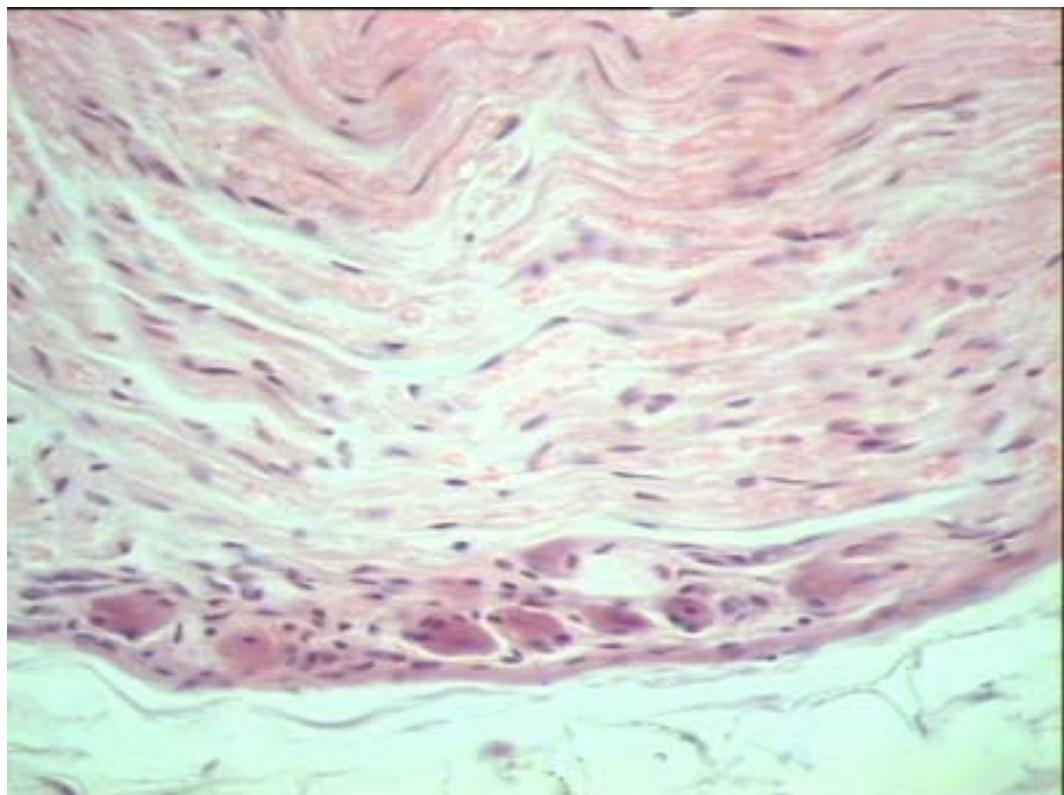
En el NLI también se observan, de forma incostante (Tabla 4.1), pequeños acúmulos de entre 4 a 8 células dispersos a largo de las ramas A1, A2 y del plexo nervioso que las une. La mayoría de las células se encuentran situadas entre el epineuro y las fibrillas nerviosas y en menor número dispersas también entre las fibrillas nerviosas.

En la rama P1, y de forma constante, aparece un acúmulo celular no encapsulado formado por un número de entre 4 y 6 células dispersas entre las fibras nerviosas (Tabla 4.1). Es un ganglio mucho más pequeño que el anterior, su altura oscila entre 0,05-0,01mm. El ganglio se encuentra situado en el trayecto de la rama P1 a una distancia de entre 0,5 cm y 1 cm del origen de la rama (media, 0,9 cm). En su constitución, al igual que en el ganglio anterior, participan células principales, de gran tamaño y forma poligonal, y celulas satélites, de pequeño tamaño e intensamente basófilas (Figura 4.3).



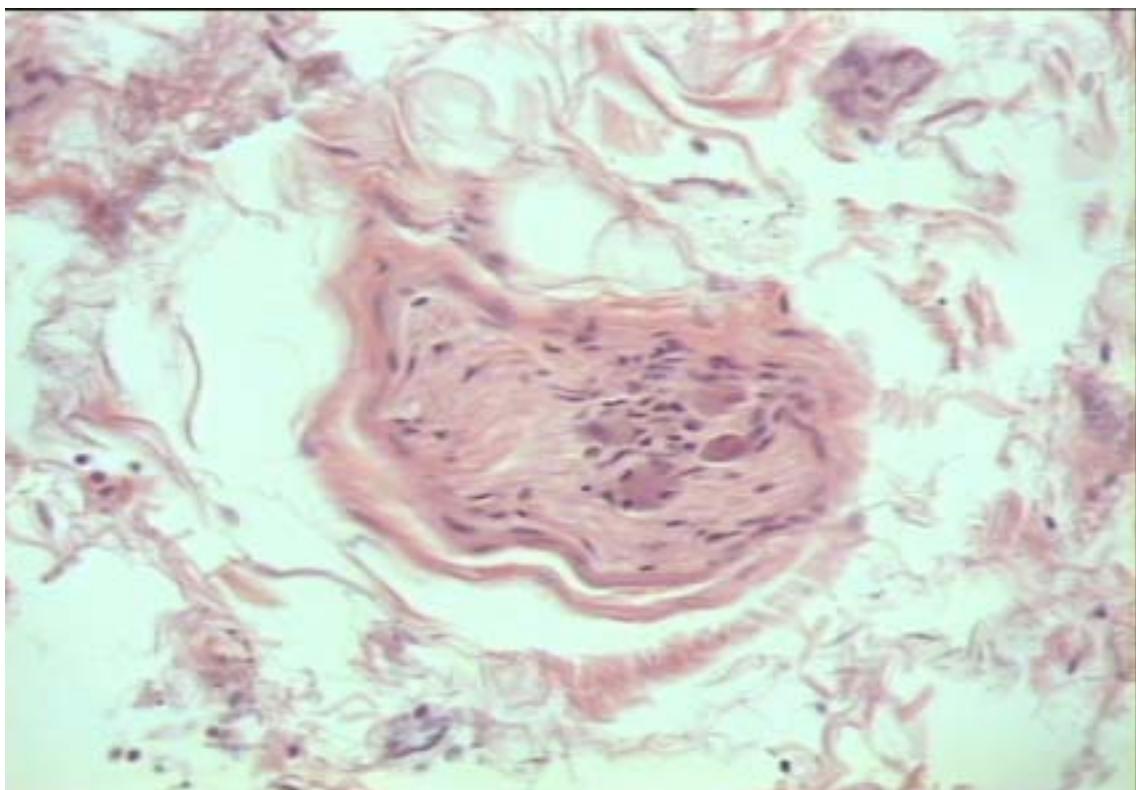
**Figura 4. 3.** Ganglio asociado a la rama P1 del NLI (X20). La imagen muestra una pequeña agrupación de 10 células dispuestas entre las fibras nerviosas. Contrastar el escaso número de células de este ganglio con el que aparece en la rama A1.

En cuatro de los seis nervios estudiados aparece una tercera agrupación de células situadas en la rama S. Esta agrupación, al igual que la anterior, consiste en 10 a 15 células no encapsuladas, y distribuidas entre las fibras nerviosas (Figura 4.4). Están localizadas a una distancia de entre 0,9 cm a 2 cm (media de 1,3 cm) a partir del origen del tronco nervioso



**Figura 4.4.** Ganglio asociado a la rama S del NLI (X40). La foto muestra un pequeño reguero de células situadas en la periferia del nervio. Tinción de H-E.

Por último, en la mitad de los nervios analizados hemos observado la presencia de varias células ganglionares, entre 3 ó 4 celulas, aisladas y dispersas por la rama muscular o rama P2 del NLI, a una distancia del origen del tronco de entre 0,5 cm a 1,3 cm (media de 0,9 cm) (Figura 4.5).



**Figura 4.5.** Ganglio asociado a la rama P2 del NLI (X40). Imagen que muestra un reducido número de células no siempre constantes en esta rama. Tinción de H-E

#### 4. 2. Distribución del Nervio Recurrente (NR).

En todas las disecciones, hemos observado, que el nervio recurrente se divide antes de llegar a la articulación cricotiroidea en dos ramas terminales (anterior y posterior).

La rama posterior continúa el trayecto ascendente del tronco principal apoyada sobre los músculos cricoaritenoideo posterior y aritenoideo, por debajo de la mucosa del seno piriforme, antes de unirse con la rama homónima del NLI para formar el asa de Galeno (Figura 4.6).

La rama anterior, inicialmente tiene un trayecto vertical, por detrás de la articulación cricotiroidea, para posteriormente inflexionarse ventralmente e iniciar un trayecto oblícuo en el espacio paraglótico apoyada sobre los músculos cricoaritenoideo lateral y tiroaritenoideo donde termina perforando las fibras de este último músculo. A largo de su trayecto suministra diferentes ramas colaterales para todos los músculos intrínsecos de la laringe excepto el cricotiroideo (Figura 4.6).

La rama más caudal (A1) se dirige a la cara profunda del músculo cricoaritenoideo posterior. En nuestro material el número de ramas para el cricoaritenoideo posterior variaba de dos a cuatro ramas (Figura 4.6). La siguiente rama en sentido ascendente (A2), aunque transita por debajo del músculo cricoaritenoideo posterior acaba inervando al músculo aritenoideo (Figura 4.6). En dos de los especímenes de nuestro material esta rama también daba una rama colateral para el músculo cricoaritenoideo posterior. La siguiente rama (A 3), se distribuía por el músculo cricoaritenoideo lateral (Figura 4.6) y finalmente, la última rama colateral (A 4), se corresponde al

trayecto terminal del nervio que acaba perdiéndose entre las fibras del músculo tiroaritenoideo (Figura 4.6).



**Figura 4.6.** Visión del nervio recurrente aislado con sus ramas terminales y colaterales principales. P, rama posterior que forma con el NLI el asa de Galeno. T-OE, ramas traqueo-esofágicas. A, rama anterior. A1, rama para el músculo cricoaritenoideo posterior. A2, rama para el músculo interaritenoideo. A3, rama para el músculo cricoaritenoideo lateral. A4, rama para el músculo tiroaritenoideo.

#### 4.2. 1. Ganglios: número y localización.

A lo largo del trayecto intralaríngeo del nervio recurrente observamos un total de 5 ganglios, dos de forma constante y tres de forma incostante en el material analizado (Tabla 4.2).

MATERIAL	LOCALIZACIÓN	NÚMERO	TAMAÑO
Adultos humanos (n=3)	NR: A-P	1 ganglio constante	0,1-0,2 mm
	NR: A	1 ganglio constante	40-80 $\mu$
	NR: A 1	células dispersas inconstantes	
	NR: A 3	células dispersas inconstantes	
	NR: A 4	células dispersas inconstantes	

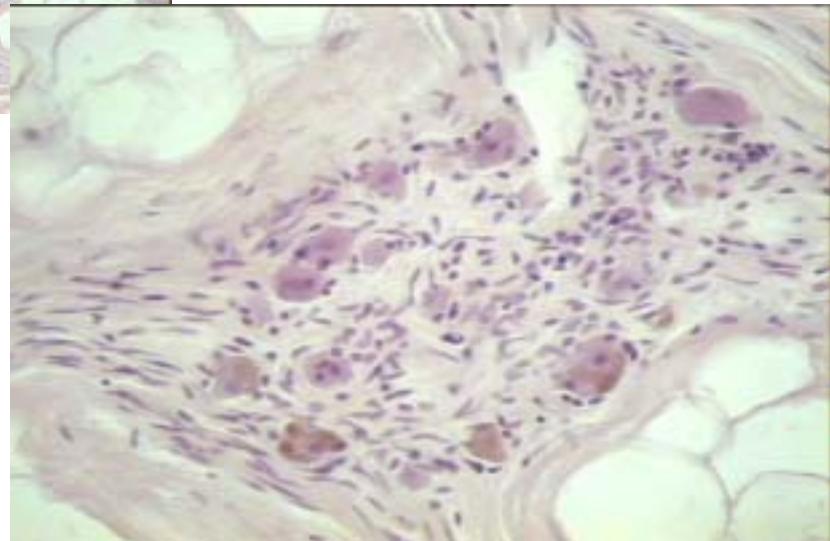
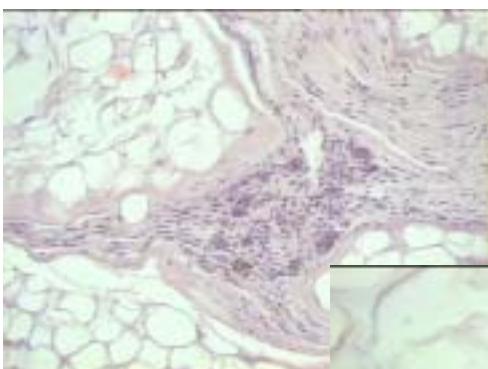
Tabla 4.2: Número y localización de los ganglios asociados a el NR

AP: bifurcación entre las ramas anterior y posterior. A: rama anterior. A 1: rama para el músculo cricoaritenoideo posterior. A3: rama para el músculo cricoaritenoideo lateral. A4: rama para el músculo tiroaritenoideo.

El ganglio de mayor tamaño aparece constante en todos los nervios recurrentes localizado en el tronco principal del nervio justo en relación con el nivel de división en sus ramas terminales (Tabla 4.2). Este ganglio se sitúa a una distancia de entre 1,2cm y 1,5 cm (media de 1,3 cm) proximal al origen de la primera rama para el músculo cricoaritenoideo posterior. El tamaño del ganglio, aparentemente encapsulado, varia entre 0,1-0,2 mm, con una celularidad que oscila entre 50 a 100 células (Figura 4.7.a).

Las células principales, de mayor tamaño, son de forma poligonal con un citoplasma granular basófilo y un núcleo pequeño y excéntrico (Figura 4.7.b). Rodeando a estas células se observan pequeñas células satélites que presentan un núcleo muy hiperchromático (Figura 4.7.b). Entre los diferentes tipos de células se observa un gran número de fibras nerviosas. No observamos la presencia de capilares (Figura 4.7.b).

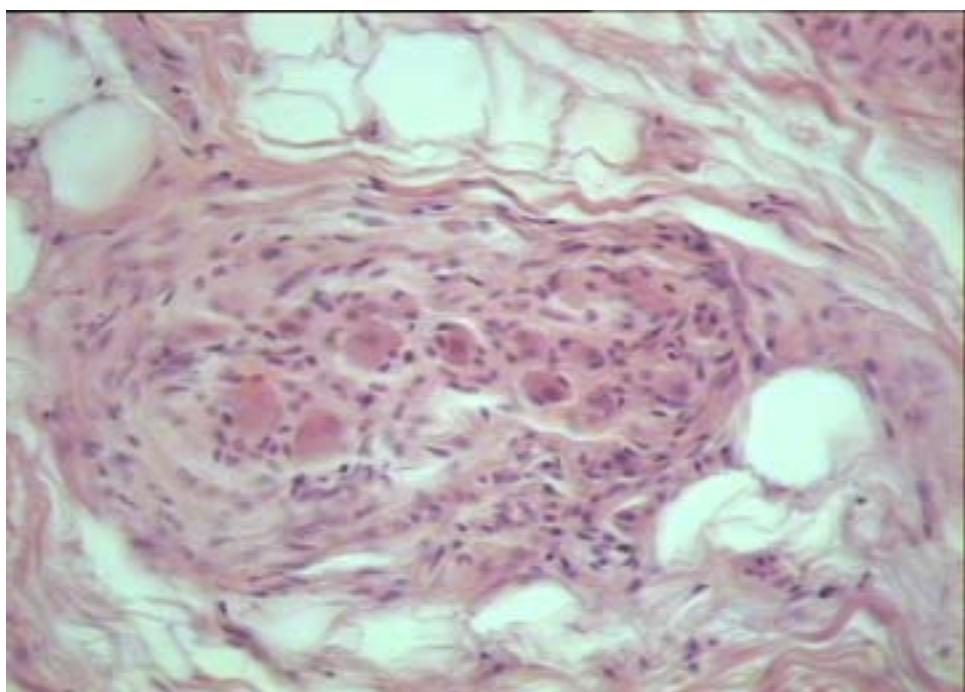
**Figura 4.7.a**



**Figura 4.7.b.**

**Figura 4.7. (a-b).** Ganglio situado en la bifurcación de las ramas anterior y posterior del NR. Tinción H-E. **4.7.a** (X20), muestra un ganglio más compacto que el que se observa en la foto 4.2.a y b, encapsulado, con abundante celularidad distribuida entre las fibras nerviosas del nervio. **4.7.b.** Detalle del ganglio (X40), donde se observan las células principales y satélites

La segunda agrupación ganglionar constante, más pequeña, se encuentra situada en la rama anterior, entre el origen de la rama para los músculos interaritenoideo y cricoaritenoideo lateral, aproximadamente al nivel de su entrada en la laringe (Tabla 4.2). Se halla a una distancia media de 0,9 cm (0,7-1,2 cm) por encima de la primera rama para el músculo cricoaritenoideo posterior. Su tamaño en altura es de entre 40-80 $\mu$ , también es encapsulado (Figura 4.8).



**Figura 4.8.** Ganglio situado en la rama anterior del NR a su entrada en la laringe (X40). En la imagen se observa un ganglio encapsulado con menor celularidad que el de la figura 4.7. Hematoxilina-Eosina.

Estos dos ganglios, a diferencia de los observados en el NLI tienen sus células dispuestas de forma compacta y aparecen encapsulados (Figuras, 4.7. a y b, Figura 4.8).

En tres de los nervios hemos observado además la presencia de células ganglionares aisladas situadas a lo largo del recorrido de las ramas para los músculos tiroaritenoideo (Figura 4.9.a), cricoaritenoideo lateral (Figura 4.9.b) y cricoaritenoideo posterior (Figura 4.9.c) (Tabla 4.2).

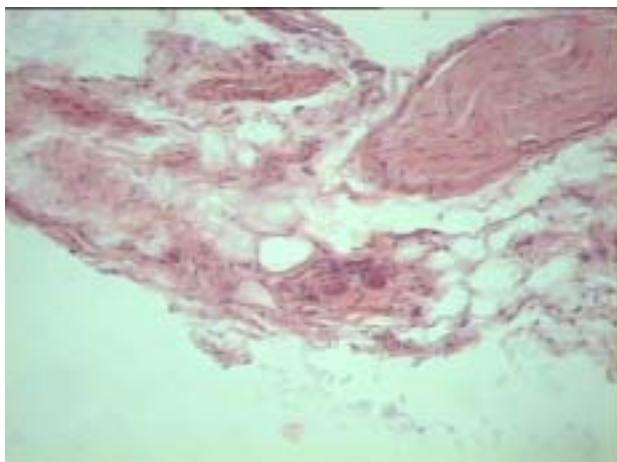


Figura 4.9.a

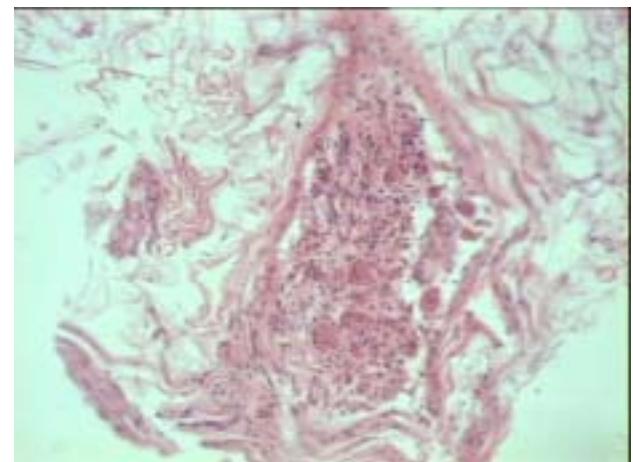


Figura 4.9.b



Figura 4.9.c

**Figura 4.9.** Células nerviosas aisladas presentes en las diferentes ramas musculares del nervio recurrente, **4.9.a** en la rama para el músculo tiroaritenoideo A4 (X40), **4.9.b.** en la rama para el músculo cricoaritenoideo lateral A3 (X40), **4.9.c.** en la rama para el músculo cricoaritenoideo posterior A1(X40). Tinción H-E

### 4.3. NATURALEZA INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS GANGLIOS

El estudio inmunohistoquímico de los ganglios arriba mencionados se centró en el asociado a la rama A1 del NLSI y en el presente en el NR a su entrada en la laringe ya que se correspondían, por su situación, con los descritos en la literatura como paraganglios laríngeos superior e inferior.

Desde un punto de vista técnico debemos señalar que los mejores resultados se obtuvieron en las series que se realizó el calentamiento de los portas en microondas. Los resultados fueron más óptimos cuando se realizó dos ciclos de calentamiento que cuando únicamente se realizó uno, especialmente para el desenmascaramiento de los neuropeptidos.

#### 4.3.1. GANGLIO ASOCIADO A LA RAMA A 1 DEL NLI

##### CROMOGRANINA A (Cr A)

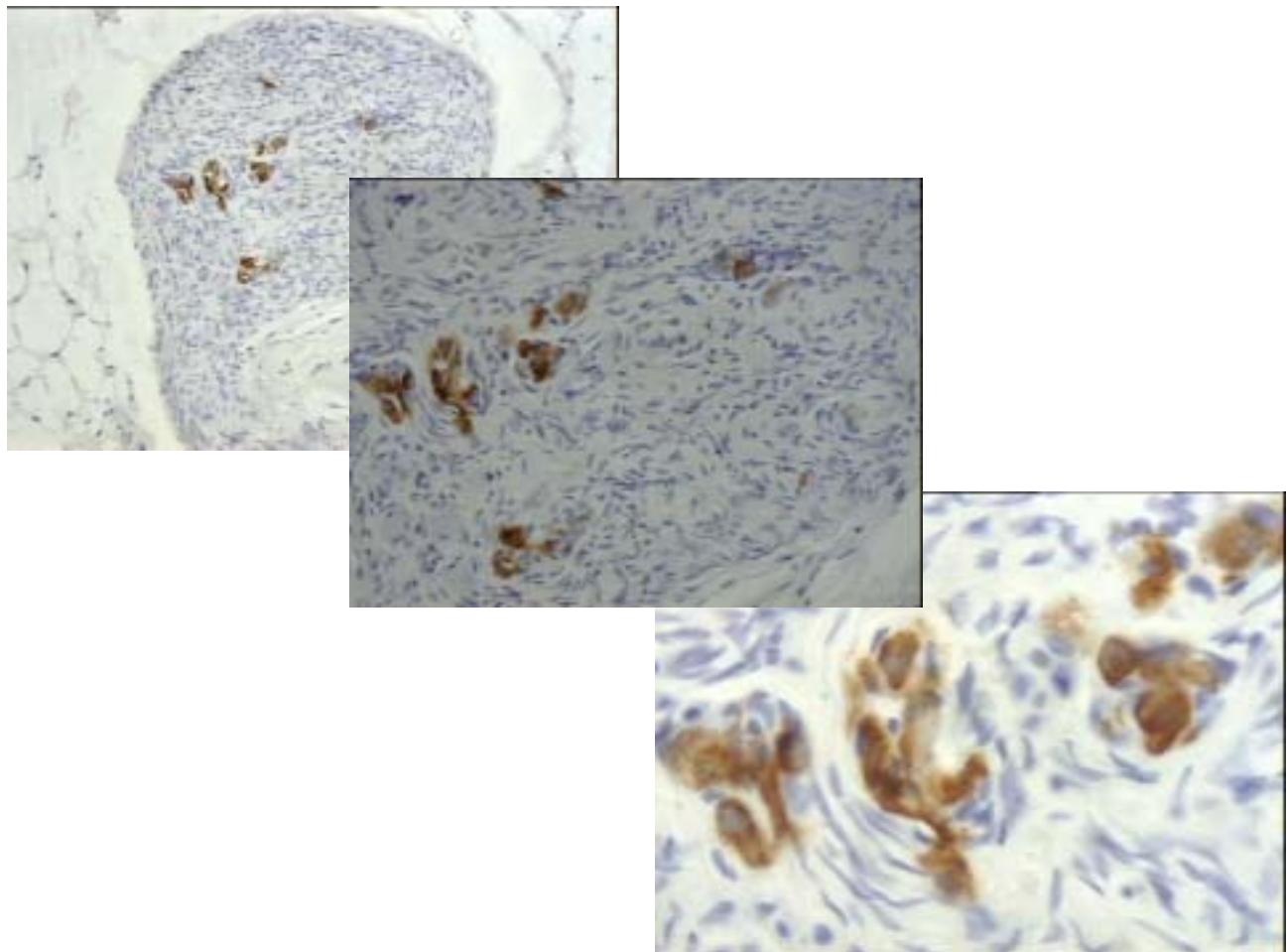
En cuatro de los cinco ganglios estudiados encontramos que aproximadamente un tercio de sus células presentaban una intensa positividad para esta proteína (Figura 4.10.a-c). Esta positividad se apreciaba por la presencia de un color marrón pardo en el citoplasma de las células que a veces tenía un aspecto granular y otras más difuso (Figura 4.10.a-c). Algunas de las fibras que rodeaban a estas células también aparecían teñidas de este color marronoso (Figura 4.10. b y c).

En uno de los ganglios estudiados no se pudo observar presencia de cromogranina en ninguna de las células. La posible causa pudo ser un exceso en la fijación del tejido en el que un único ciclo de calentamiento en microondas

no pudo posiblemente desenmascarar del formol la presencia de cromogranina

A.

**Figura 4.10. a**



**Figura 4.10.c**

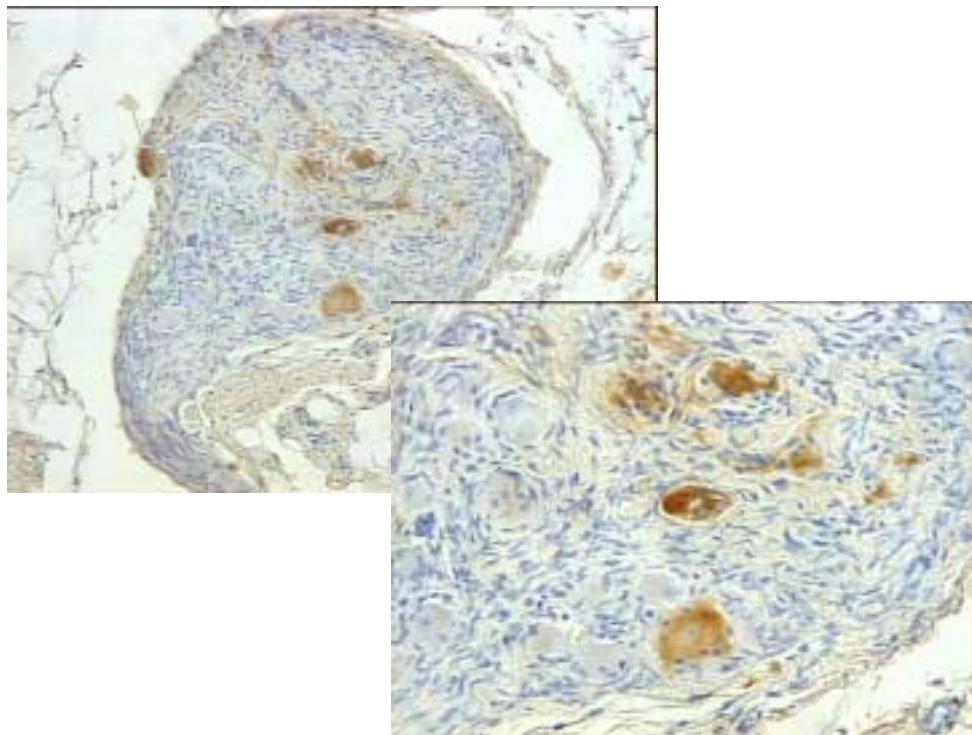
**Figura 4.10.(a-c).** Cromogranina A (a, X20; b, X40 y c, X100). Ganglio asociado a la rama A1. La imagen muestra una inmunorreacción positiva para la Cr A en una pequeña agrupación de células. Se observa la tinción intracitoplasmática de las células y de parte de las fibras nerviosas que rodean a las mismas. También se observa el aspecto difuso de la tinción intracitoplasmática de las células. En alguna de ellas se puede apreciar una tinción con aspecto más granulomatoso. Técnica de A-B-P y contratinción con hematoxilina de Ehrlich

## TIROSINA HIDROXILASA (TH)

En los cinco ganglios se observó siempre en un número reducido de células, la presencia de una moderada a débil tinción difusa marronosa en su citoplasma (Figura 4.11.a-b). En algunas de las fibras que se hallaban en la periferia de estas células también se encontró de una moderada a débil tinción para la TH. (Figura 4.11.a-b)

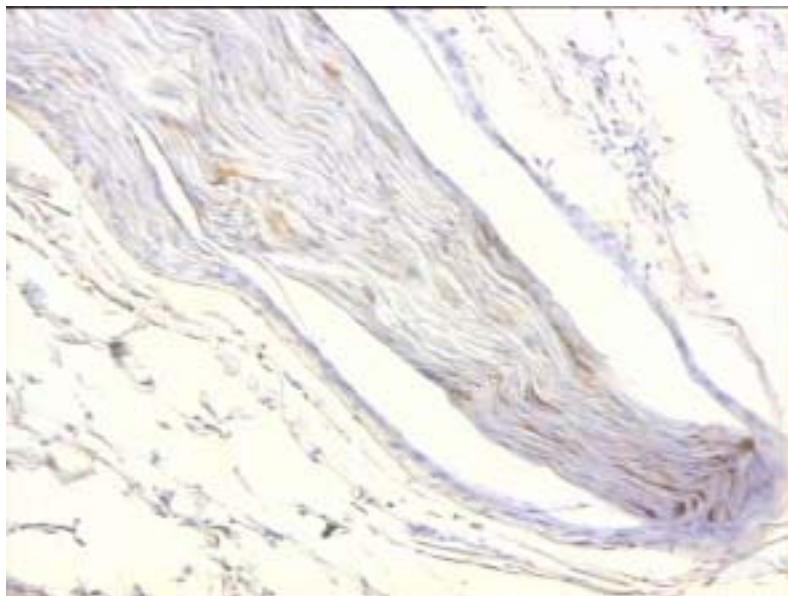
En cuatro de los cinco NLI se observaron en su recorrido fibras que mostraban una intensa tinción positiva para la TH (Figura 4.12).

**Figura 4.11.a**



**Figura 4.11.b**

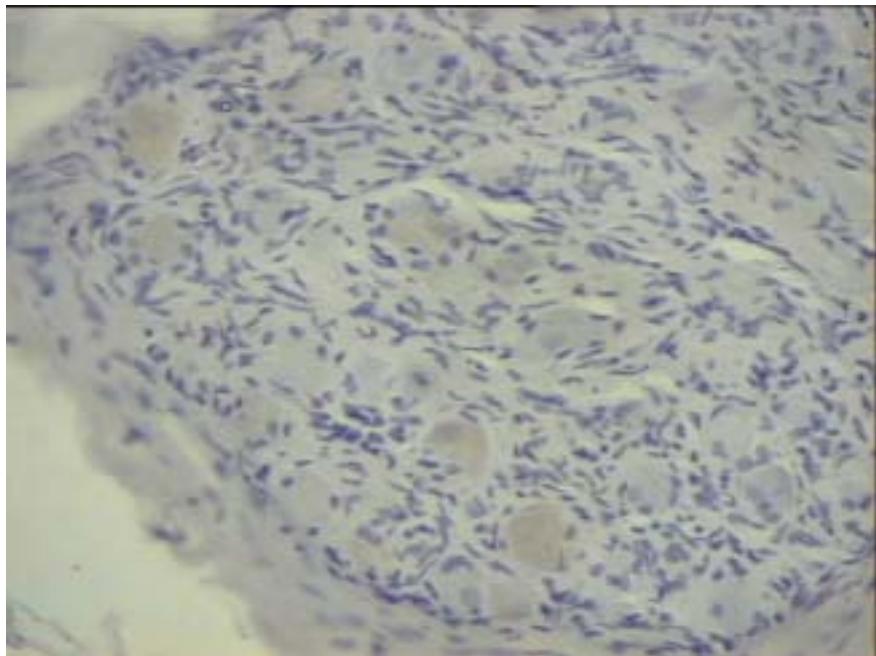
**Figura 4.11 (a-b).** Tirosina Hidroxilasa (a, X20 y b X40). Ganglio asociado a la rama A1 del NLI. La imagen muestra la presencia de 4-5 células cuyo citoplasma presenta una clara inmunorreactividad para la TH. Técnica de A-B-P y contratinción con hematoxilina de Ehrlich.



**Figura 4.12.** Tirosina Hidroxilasa (X20). NLI. Fotografía de una de las ramas del NLI donde se observa una gran presencia de fibras nerviosas que presentan immunorreactividad positiva para la TH. Técnica de A-B-P y contratinción con hematoxilina de Ehrlich.

### ACETILCOLINA TRANSFERASA (ChAT)

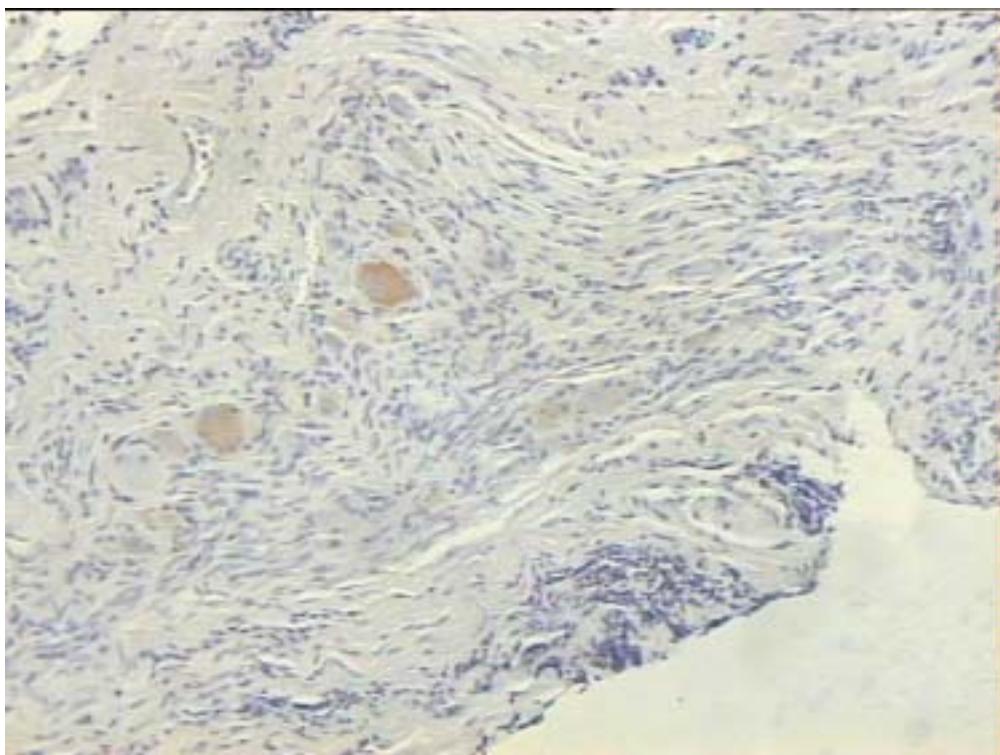
En los tres ganglios analizados se encontró un reducido número de células, entre 6-7 células en cuyo citoplasma se observaba una débil y difusa tinción para este encima (Figura 4.13). No se evidenció la presencia de fibras positivas ni en la periferia de las células ni en recorrido del nervio.



**Figura 4.13.** Acetilcolina transferasa (X40). Ganglio asociado a la rama A 1 del NNI. Las células muestran una débil y difusa tinción en su citoplasma. Técnica de A-B-P con 2 ciclo de microondas y contratinación con hematoxilina de Ehrich.

#### **VASOACTIVE INTESTINAL POLYPEPTIDE (VIP)**

La incubación con antisuero anti-VIP evidenció su presencia en un número reducido de células, variable entre 3 ó 5, únicamente en los dos ganglios de los cuatro que recibieron los dos ciclos de microondas. Estas células mostraban una tinción de aspecto difuso y uniforme en el interior de su citoplasma. También se pudo apreciar un débil marcaje de alguna de las fibras nerviosas que estaban en la proximidad de estas células. (Figura 4.14)

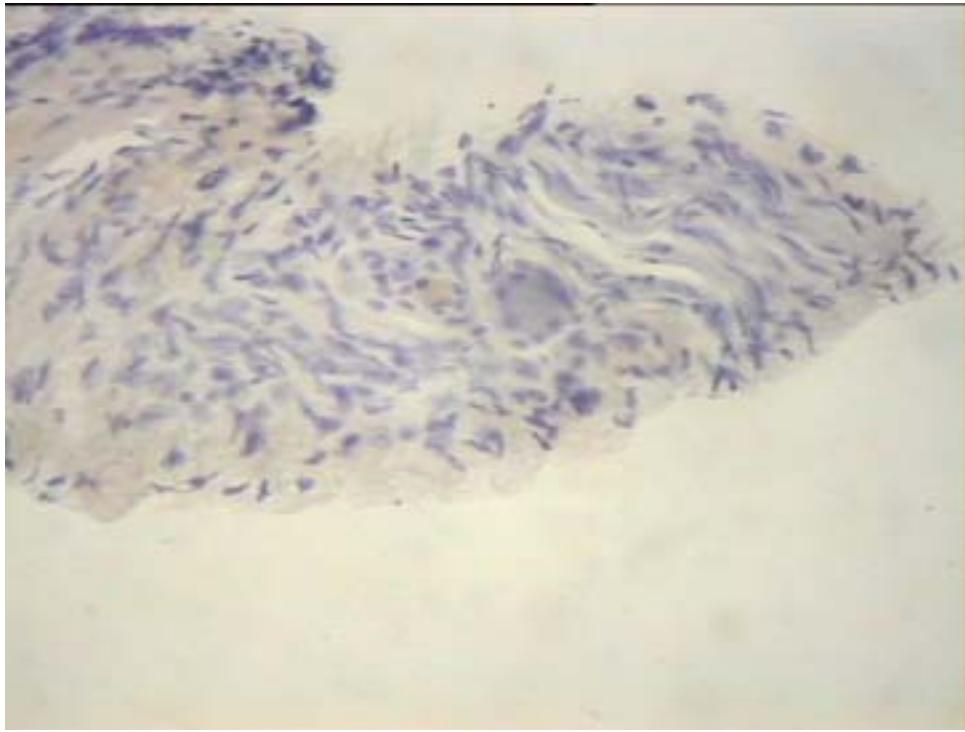


**Figura 4.14.** VIP (X40). Ganglio asociado a la rama A 1 del NNI. Células dispersas inmunorreactivas al VIP. Técnica de A-B-P con dos ciclo de microondas y contratinción con hematoxilina de Ehrlich.

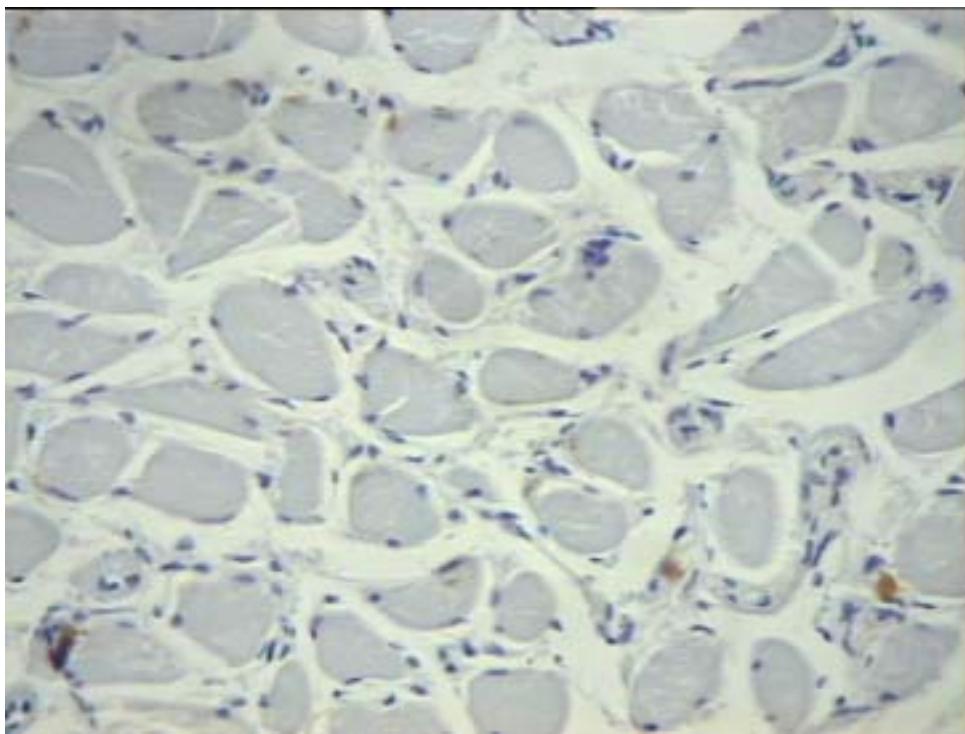
### NEUROPEPTIDO Y (NPY)

Los resultados obtenidos tras la incubación de las muestras con el antisuero anti-NPY mostraron en dos de los tres ganglios estudiados una escasísima inmunorreactividad frente a este Neuropeptido, identificándose alguna célula aislada cuyo citoplasma aparecía marcado de manera muy tenue y difusa. (Figura 4.15)

En uno de los cortes, se observaba la presencia del músculo interaritenoideo donde se apreciaba una inmunorreactividad positiva para el NP-Y en la periferia de las fibras musculares. (Figura 4.16)



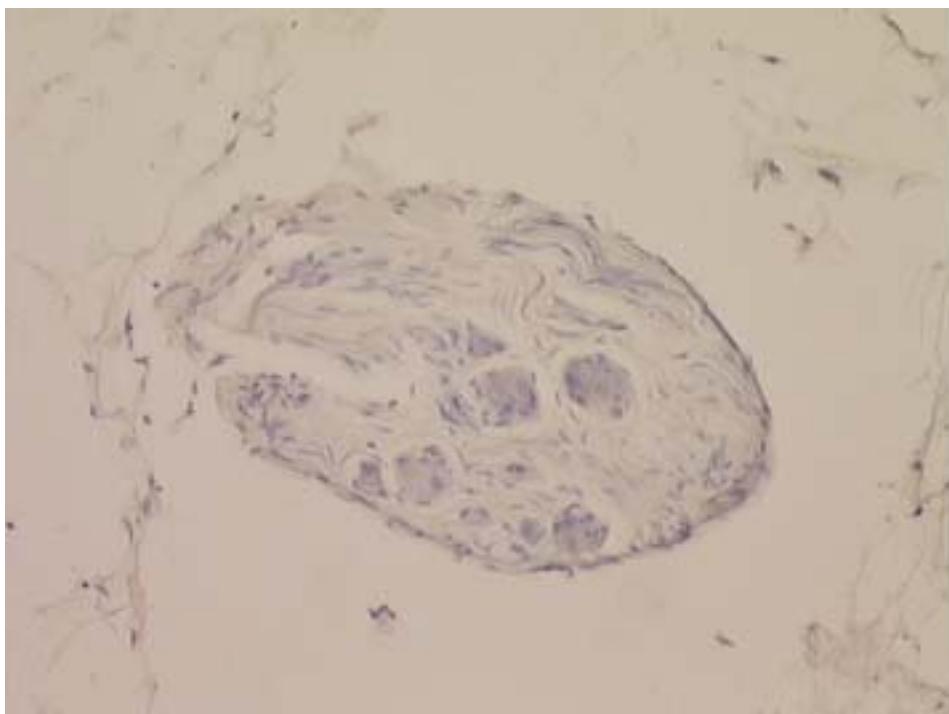
**Figura 4.15.** NP-Y (X40). Ganglio asociado a la rama A 1 del NLI. Celula inmunorreactiva al NP-Y. Técnica de A-B-P con dos ciclo de microondas y contratinción con hematoxilina de Ehrlich



**Figura 4.16.** NP-Y (x40). Músculo aritenoideo. En la periferia de las fibras musculares aparecen una serie de fibras nerviosas inmunorreactivas para el NP-Y. Técnica de A-B-P con dos ciclo de microondas y contratinción con hematoxilina de Ehrlich.

## SUSTANCIA P (SP)

En los dos ganglios que se incubaron con antisuero anti-SP evidenció una débil y difusa inmunorreactividad en la periferia del citoplasma de alguna de las células presentes en los ganglios. No se observó ningún tipo de marcaje ni en la periferia de la célula ni en las fibras nerviosas vecinas.

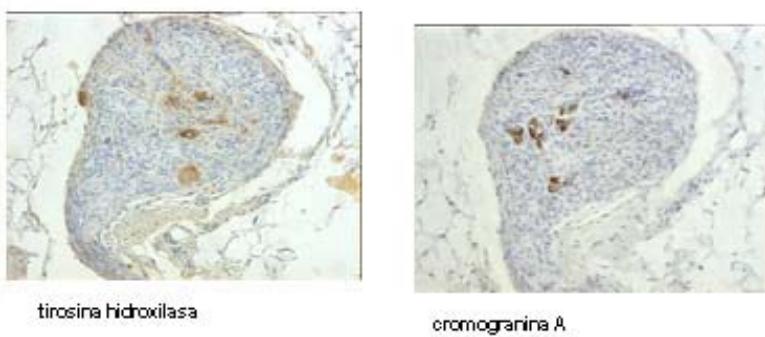


**Figura 4.17.** SP (x40). Ganglio asociado a la rama A 1 del NLI. La microfotografía muestra la dudosa inmunorreactividad encontrada en alguna célula Técnica de A-B-P con dos ciclo de microondas y contratinción con hematoxilina de Ehrlich.

## CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE (CGRP)

La aplicación del anticuerpo anti-CGRP demostró en los dos ganglios estudiados una inmunorreactividad negativa frente a este neuropeptido tanto en las células como en las fibras presentes en las muestras.

En resumen, en el ganglio presente en la rama A 1 del NLSI se halla un grupo pequeño de neuronas, entre 10 a 15, en cuyo citoplasma se encuentran presente la Cr A, otro grupo de neuronas que probablemente sea el mismo que el anterior (Figura 4.18) que muestra una positividad para la tirosina hidroxilasa y por último, un tercer grupo de neuronas más reducido que los dos anteriores que muestra una débil inmunorreactividad para la ChAT. Además se encuentran algunas neuronas dispersas que presentan inmunorreactividad para el VIP y el NP-Y y alguna que otra que muestra una dudosa positividad para la SP mientras que no se ha observado ninguna neurona inmunorreactiva para el CGRP. Algunas de las fibras nerviosas distribuidas en la periferia de estas neuronas muestran una positividad para la Cr A, la TH, el VIP y el NP-Y mientras que en ninguna hemos podido observar inmunorreactividad para la ChAT, la SP y el CGRP (Tabla 4.3).



**Figura 4.18.** La fotomicrografía muestra dos cortes del mismo ganglio situado en la rama A1 en los que se puede apreciar que existe cierto paralelismo entre las células teñidas para la cromogranina A y las teñidas para la tirosina hidroxilasa.

SIN MW	Cr A	TH	ChAT	VIP	NP Y	SP	CGRP
	f + cc ++ n= 1	cc ++ f++ n=2	cc + n= 1	cc - n=1			
1 CICLO DE MW	Cr A	TH	ChAT	VIP	NP Y	SP	CGRP
	cc+ n=1	cc ++ f++ n=2	cc + n= 1				
	cc - n=1			cc - n=1	cc - n=1	cc - n=1	cc - n=1
2 CICLOS DE MW	Cr A	TH	ChAT	VIP	NP Y	SP	CGRP
	f + cc + n=2	cc ++ f++ n=1	cc+ n=1	cc + f+ n=2	cc + f+; m+ n=2	cc + n=1	cc - n=1

**Tabla 4.3.1 Resultados obtenidos en relación al ganglio asociado a la rama A1 del NLI (paraganglio laríngeo superior)**

muchas intensidad +++  
normal intensidad ++  
débil intensidad +  
negativo -

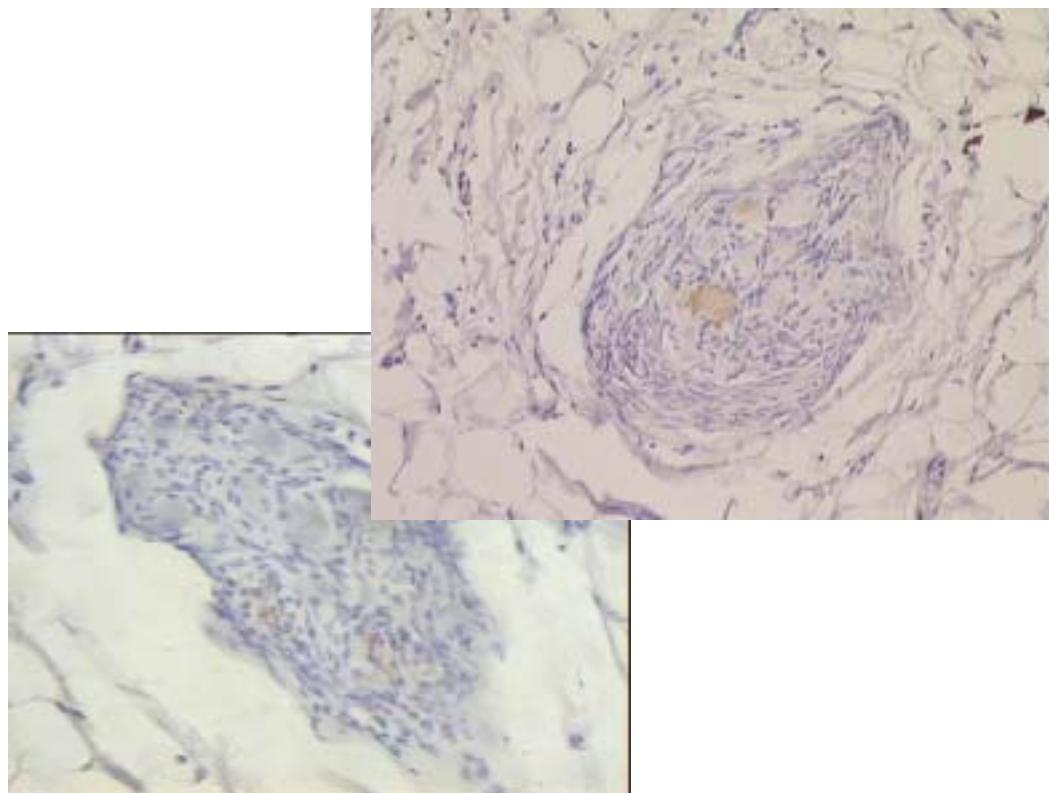
cc: cuerpo celular  
f: fibra nerviosa  
m: músculo  
MW: microondas

#### 4.3.2. GANGLIO ASOCIADO A LA RAMA ANTERIOR DEL NR

##### CROMOGRANINA A (Cr A)

En los dos ganglios que habían recibido dos ciclos de calentamiento en microondas se apreciaba en el citoplasma de un escaso número de células (2 a 3) una tinción marronosa difusa de mayor intensidad (Figura 4.19.a) que la observada en los tres ganglios que sólo fueron sometidos a un ciclo de microondas (Figura 4.19.b). En ambos casos se podía apreciar la presencia de fibras nerviosas inmunorreactivas para la Cr A en la periferia de las células. En los otros tres ganglios que no habían recibido ningún ciclo de microondas no se observó ninguna célula o fibra positiva para esta proteína.

**Figura 4.19.a**



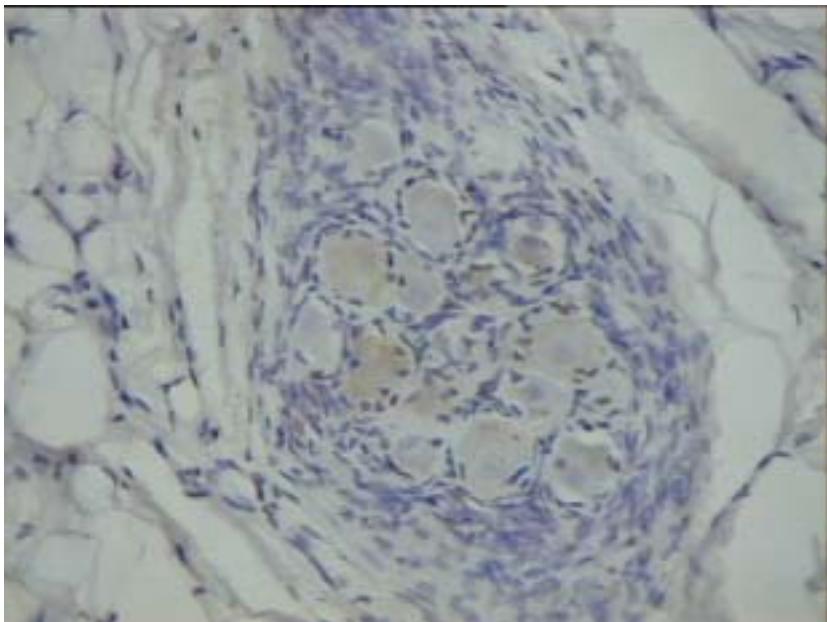
**Figura 4.19.b**

**Figura 4.19. (a-b).** Cromogranina A (X20). Ganglio asociado a la rama anterior del NR. **4.19.a.** muestra inmunoreactividad en alguna célula dispersa tras dos ciclos de microondas. **4.19.b** inmunoreactividad en alguna célula dispersa tras un único ciclo de microondas. Técnica de A-B-P con un sólo ciclo de microondas y contratinación con hematoxilina de Ehrlich.

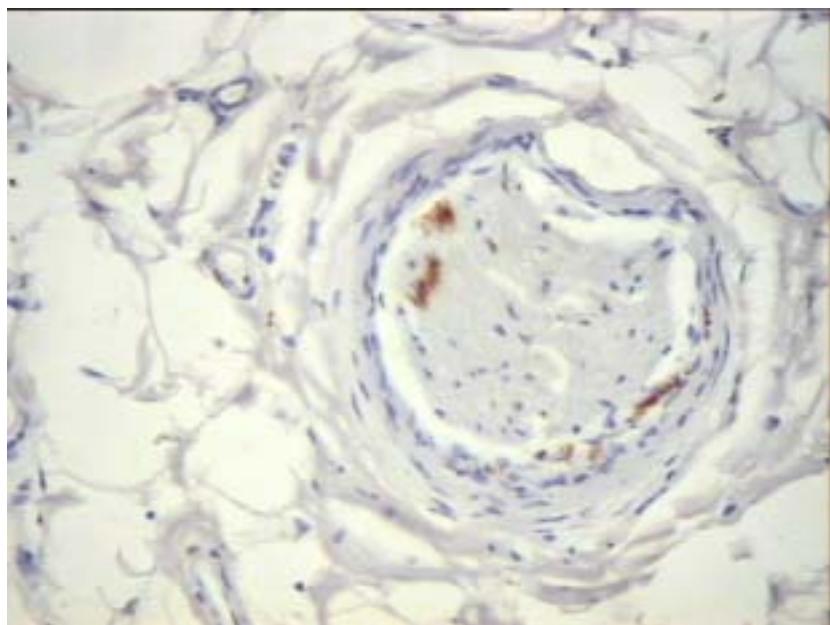
## TIROSINA HIDROXILASA (TH)

En cinco de los siete ganglios apareció una proporción escasa de células que mostraron una débil y difusa tinción en su citoplasma. No se observó positividad en las fibras nerviosas vecinas a estas células (Figura 4.20) En el recorrido de cuatro de los seis NR se encontraron fibras positivas para la TH pero en menor proporción que las observadas en el NLI (Figura 4.21)

Los resultados fueron sensiblemente superiores cuando se realizaron los dos ciclo de calentamineto en el microondas.



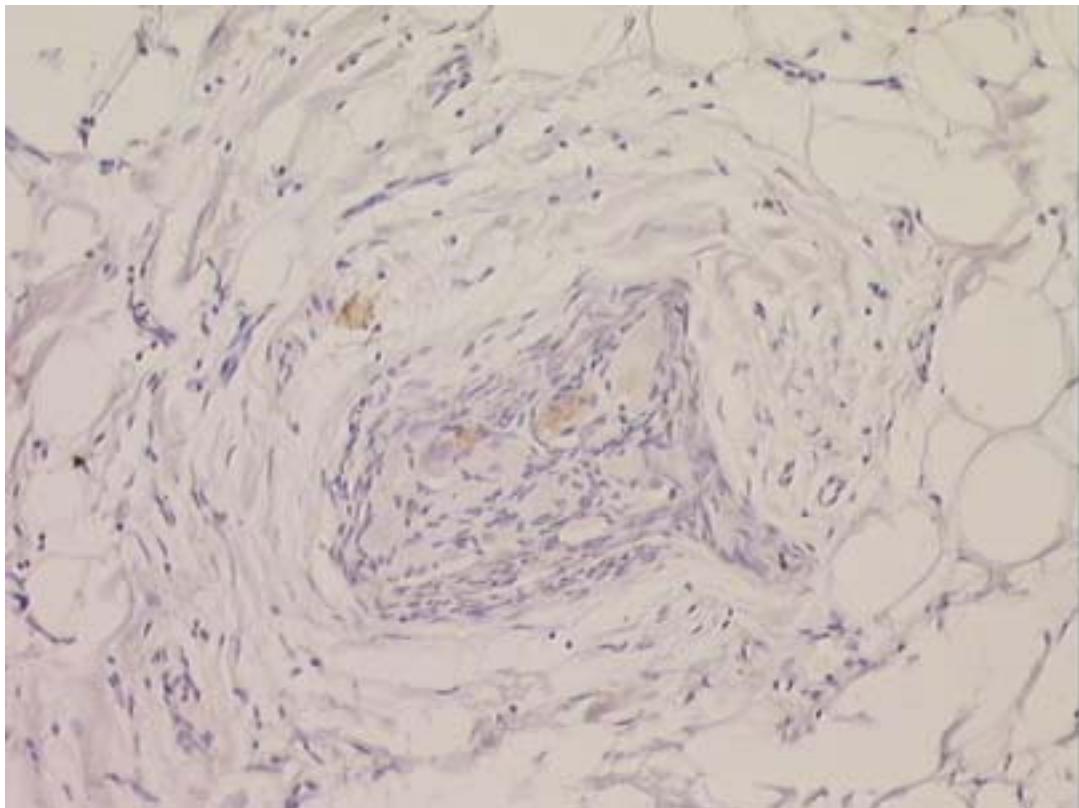
**Figura 4.20.** Tirosina Hidroxilasa (X20). Ganglio asociado a la rama anterior del NR. La foto muestra la débil inmunorreactividad que se aprecia en alguna de las células presentes en este ganglio. Técnica de A-B-P con dos ciclos de microondas y contratinción con hematoxilina de Ehrlich.



**Figura 4.21.** Tirosina Hidroxilasa (X40). NR. La microfotografía muestra una rama del NR donde se puede observar la presencia de un número pequeño de fibras inmunorreactivas para la TH. Técnica de A-B-P y contratinación con hematoxilina de Ehrlich.

### ACETILCOLINA TRANSFERASA (ChAT)

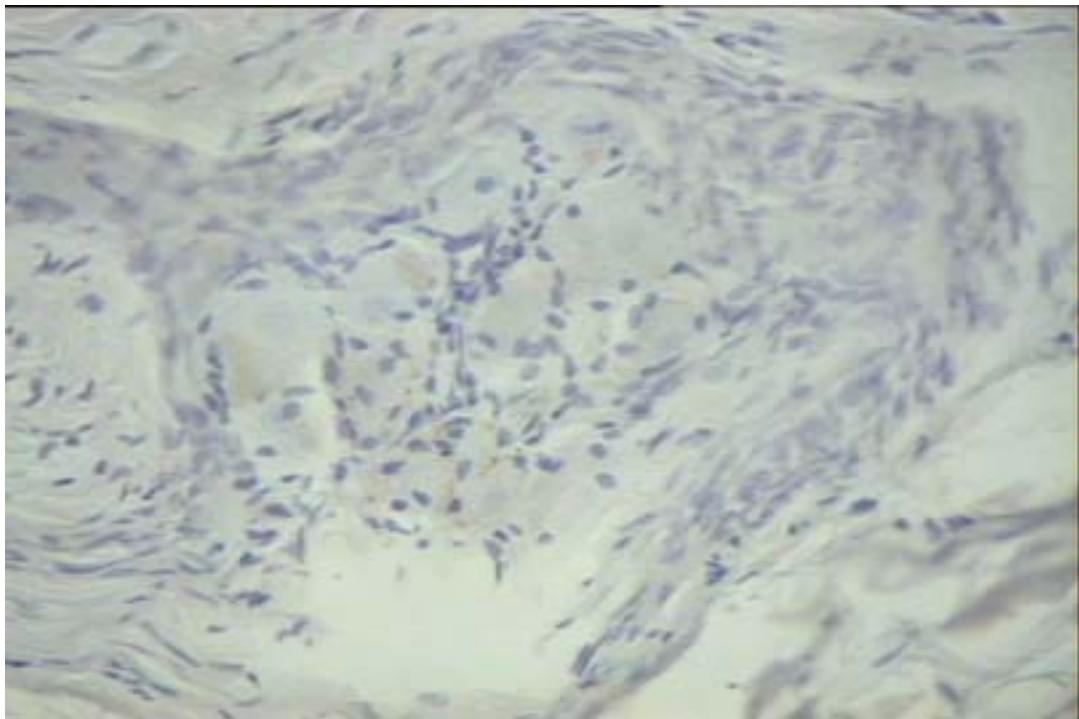
En los cuatro ganglios que se estudiaron se observó un escaso número de células que mostraban una débil y difusa tinción en el citoplasma de sus células. Tampoco se observaron fibras positivas para el ChAT. (Figura 4.22)



**Figura 4.22.** Acetilcolina transferasa (X40). Ganglio asociado a la rama anterior del nervio recurrente. La imagen muestra la escasa immunorreactividad que se encontró en este ganglio. Técnica de A-B-P con 2 ciclo de microondas y contratinación con hematoxilina de Ehrlich.

#### **VASOACTIVE INTESTINAL POLYPEPTIDE (VIP)**

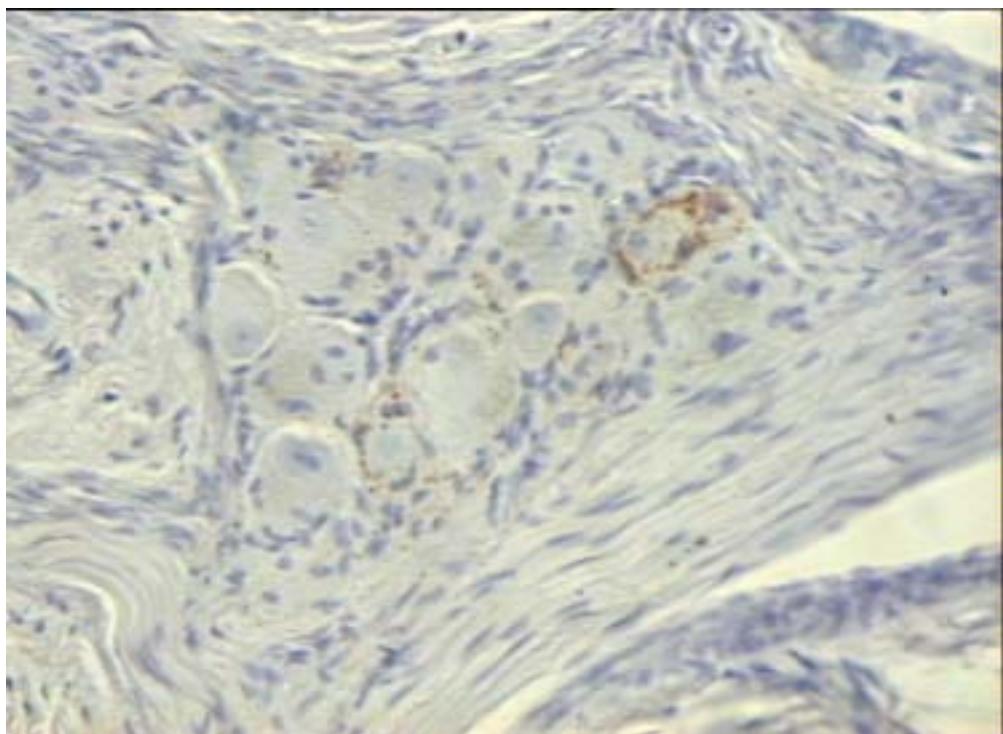
En dos de los tres ganglio encontramos una positividad en un escaso número de células que era de menor intensidad que la observada en el NLI. Las células mostraban en su citoplasma una tinción de color marronoso y aspecto granular, especialmente en la zona más periférica. En algunas áreas se podía apreciar un marcaje pericelular que podría corresponderse a fibras nerviosas situadas en su inmediata periferia. (Figura 4.23)



**Figura 4.23.** VIP (X40). Ganglio asociado a la rama anterior del NR. Se aprecia una difusa y débil positividad en el citoplasma de alguna células presentes en este ganglio. Técnica de A-B-P con dos ciclo de microondas y contratinción con hematoxilina de Ehrlich.

### NEUROPEPTIDO Y (NPY)

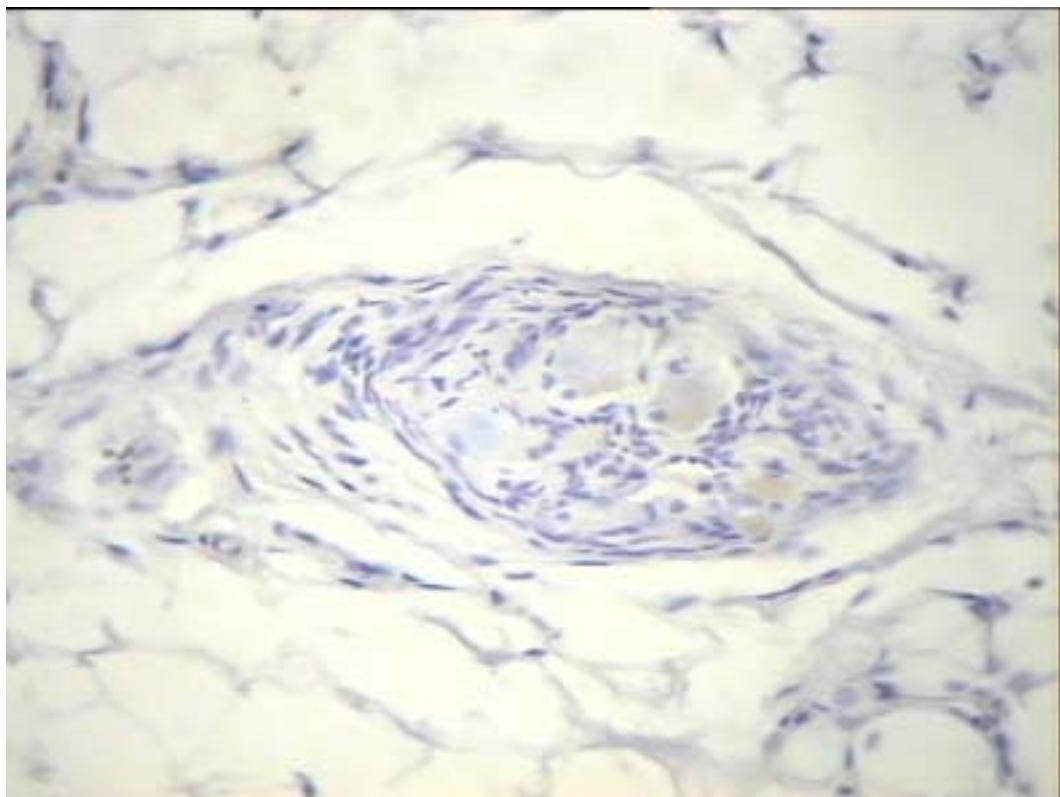
La aplicación del antisuero anti-NPY en este caso mostraba una clara tinción pericelular en alguna de las células presentes en este ganglio. Esta tinción tenía un aspecto granular, arrosariado, rodeando el contorno celular. El citoplasma de estas células en su zona más periférica aparecía teñido de forma menos intensa y difuso (Figura 4.24)



**Figura 4.24.** NP-Y (x40). Ganglio asociado a la rama anterior del NR. Fibras nerviosas pericelulares inmunorreactivas para el NP-Y junto a una débil y difusa tinción citoplasmática presente en alguna de las células. Técnica de A-B-P con dos ciclo de microondas y contratinación con hematoxilina de Ehrlich.

### **SUSTANCIA P (SP)**

Los resultados son muy similares a los obtenidos en el ganglio del NLI. En los dos ganglios que se incubaron con el antisuero correspondiente se observó un débil y difuso marcaje en la periferia del citoplasma de las células sin que tampoco se pudiera detectar la presencia de fibras inmunorreactivas para el antisuero anti-SP. (Figura 4.25)



**Figura 4.25.** SP (X40). Ganglio asociado a la rama anterior del NR. Células con una débil y difusa inmunorreactividad para la SP. Técnica de A-B-P con dos ciclo de microondas y contratinación con hematoxilina de Ehrlich.

#### **CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE (CGRP)**

La incubación obtenida con el antisuero anti-CGRP en los dos ganglios seleccionados resultó igualmente negativa como en el caso anterior.

En el ganglio presente en la rama anterior del NR llama la atención primeramente que la intensidad de la inmunorreactividad de los marcadores estudiados es menor que la observada en el anterior ganglio y en este caso el desenmascaramiento con dos ciclos de microondas mejoró notablemente los resultados (Tabla 4.4). Al igual que en el caso del ganglio asociado a la rama A1 del NLSI encontramos un grupo de neuronas que en este caso era mucho más reducido que mostraban inmunorreactividad para la Cr A, la TH y la ChAT. Dispersas como también sucedía en el ganglio presente en la rama A1 del NLSI se encontró alguna neurona positiva para el VIP, el NP-Y y la SP mientras que no se encontró ninguna neurona positiva para el CGRP. Las fibras nerviosas que se encuentran en la periferia de las neuronas mostraron una positividad para la Cr A, el VIP y el NP-Y sin que se observara positividad alguna para el CHAT, la TH, SP, y el CGRP, sin embargo, si se observaron fibras positivas para la TH a lo largo del NR (Tabla 4.4).

SIN MW	CrA	TH	ChAT	VIP	NP Y	SP	CGRP
		cc + n=1	cc + n=1				
	cc - n=3	cc - n=1		cc - n=1			
1 CICLO DE MW	CrA	TH	ChAT	VIP	NP Y	SP	CGRP
	cc + n=2	cc + f + n=2					
	cc - n=1	cc - n=1					
2 CICLOS DE MW	CrA	TH	ChAT	VIP	NP Y	SP	CGRP
	cc ++ f++ n=2	cc++ f+ n=2	cc+ f+ n=3	cc + n=2	cc + n=1	cc + n=2	cc - n=2

**Tabla 4.4. Resultados referentes al ganglio asociado a la rama anterior del NR (paraganglio laríngeo inferior).**

muchas intensidad +++  
normal intensidad ++  
débil intensidad +  
negativo -

cc: cuerpo celular  
f :fibra nerviosa