

5. DISCUSIÓN

*"Nuestros hechos deben ser correctos.
Nuestras teorías no necesitan serlo,
si nos ayudan a descubrir importantes hechos nuevos"*
Selye

5. DISCUSIÓN

En la revisión bibliográfica hemos encontrado gran cantidad de trabajos realizados en diferentes animales de experimentación en los que se describen en diferentes localizaciones y en diferente número la presencia de ganglios autónomos y paraganglios asociados a los nervios laríngeos superior e inferior. Además existen numerosos trabajos sobre la ultraestructura, pero especialmente sobre las características inmunohistoquímicas de dichas estructuras. En referencia al material humano también existen numerosos trabajos en los que se encuentran diferencias en cuanto a la distribución y número de los ganglios autónomos y paraganglios. Sin embargo, apenas existe algún estudio ultraestructural (Ramaswamy y col., 1994) e inmunohistoquímico (Frigo y col., 1989) sobre los mismos. Este ha sido el motivo que nos ha llevado a realizar la presente Tesis doctoral, para aportar más información por un lado en lo que hace referencia a la distribución y número, y por otro sobre la naturaleza de estas estructuras asociadas a los nervios laríngeo interno y recurrente en humanos adultos.

5.1. COMENTARIOS SOBRE LA METODOLOGIA

En la presente tesis nos hemos encontrado con dificultades técnicas que han supuesto un handicap para el desarrollo de la misma.

La primera dificultad la encontramos a la hora de buscar el procedimiento que nos permitiera localizar los ganglios y/o paraganglios presentes en los nervios laríngeos procedentes de cadáveres humanos.

La localización de los paraganglios en los animales de experimentación había sido posible a través de dos métodos, la inyección intravenosa del azul de Evans y la técnica de fluorescencia inducida por la fijación en formaldheido-glutaraldheido. La primera permite identificar los paraganglios como manchas azules a lo largo de los nervios (McDonald y Blewett, 1981). Este método procede de la observación de que los vasos presentes en los paraganglios son relativamente más permeables a las tinciones inyectadas en la circulación sanguínea que los vasos presentes en el resto de los nervios y ganglios. Esta técnica fue empleada por Dahlqvist y colaboradores (1984, 1986 d, 1987 y 1991) y por Domeij y colaboradores (1987) para el estudio de los paraganglios en las laringes de las ratas. La otra técnica empleada para la identificación de los paraganglios, se basa en la fluorescencia inducida por la fijación del formaldheido-glutaraldheido (Grillo y col., 1974). Esta técnica se basa en el hecho de que las soluciones acuosas de formaldehído y las catecolaminas reaccionan formando un producto de reacción que es insoluble y fluorescente (Böck 1982). Esta técnica fue la que emplearon Gorgas y Böck (1976) y Lu y colaboradores, (1992) en la identificación de los paraganglios laríngeos presentes en la rata.

En nuestro estudio estas técnicas no pudieron ser empleadas ya que sólo son factibles desarrollarlas en animales de experimentación. Por tanto, para poder llevar acabo la localización de estas estructuras hicimos un estudio seriado de cada nervio tal como hizo Dahlqvist y colaboradores (1986 b) en laringes procedentes de cadáveres humanos para el estudio de los paraganglios en el nervio recurrente tiñendo posteriormente los cortes en hematoxina-eosina (H-E). En las secciones teñidas con (H-E) el citoplasma de las células paraganglionares aparecía tenuemente eosinófilo (Böck, 1982).

También estos órganos han sido localizados mediante el análisis de diferentes secciones de bloques de tejido fijados en tetróxido de osmio al 1 % tal como propuso Kjaergaard (1973) para el estudio del cuerpo carotídeo en fetos humanos. Este método permite además el estudio posterior a microscopia electrónica de las estructuras localizadas. Como ya comentamos en el apartado de material y métodos inicialmente intentamos realizar este mismo proceso en los nervios extraídos de laringectomías con el objeto de también estudiar posteriormente su ultraestructura. Sin embargo, la falta de resultados y la gran dificultad técnica que entrañaba nos obligó a apartarlo para otra línea de trabajo complementaria.

La segunda dificultad la encontramos en la fijación de las muestras para la realización del estudio inmunohistoquímico. El tipo de fijador inicialmente utilizado fue el formol al 10% que fue desechado rápidamente porque se producía una gran cantidad de falsos positivos y negativos y se sustituyó por el paraformaldehído al 4% tamponado con PB al 0,1 M en un pH 7,4 que es un buen fijador para la inmunohistoquímica (Woods y Ellis, 1994). En cuanto al tiempo de fijación, que resultó excesivo en la mayoría de las muestras fue un

problema más difícil y laborioso de resolver. Para corregir este problema se recurrió al desenmascaramiento a través del calentamiento con microondas, mejorándose en la mayoría de los casos los resultados obtenidos. A nuestro entender estos problemas justificarían la falta de homogeneidad de los resultados obtenidos en este apartado.

5.2. NÚMERO Y LOCALIZACIÓN DE LOS PARAGANGLIOS Y/O GANGLIOS

La descripción de ganglios anexos a los nervios laríngeos se realizó por primera vez en el siglo XIX (Remak, 1840). Posteriormente la existencia de estas formaciones ganglionares ha sido confirmada en diversos animales de experimentación, perros (Geronzi, 1904; Gryngelt y Hédon, 1907; Sugano, 1929; Lemere, 1932; Masuko y col., 1991; Shimazaki y col., 1995, Hisa y col., 1996 c), gatos (Geronzi, 1904; Tsuda y col., 1992; Tanaka y col., 1993 b; Yoshida y col., 1993; Shimazaki y col., 1995) y ratas (Gorgas y Böck, 1976; Carlsöö y col., 1982, 1983; Dahlqvist y col., 1987, 1989 b, 1990, 1991; Domeij y col., 1987, 1991 a, b, c; Hisa y col., 1996 b).

Dichas formaciones ganglionares también han sido descritas por diversos autores en material embrionario, fetal y adulto humano (Soulié y Bardier, 1907; Gynfelt y Hédon, 1908; Rubatelli, 1934; Ramaswany, 1963; Ramaswany y Kulasekaran, 1974; Watzka, 1963; Klesissanser, 1964; Schönberger, 1969; Jansen y Netty-Marbell, 1967; Zak y Lawson, 1972; Lawson y Zak, 1974; Barrios, 1977; Dahlqvist y col., 1986 b).

Sin entrar ahora en la controversia sobre si las estructuras descritas en los anteriores trabajos se corresponden a paraganglios o simplemente a ganglios autónomos, encontramos, que además existen diferencias en cuanto al número y localización de las mismas. Por tanto, en este primer apartado que tiene como objetivo una mera descripción topográfica de dichas estructuras, independientemente de la naturaleza que se les atribuya, nos limitamos a contrastar los resultados de los trabajos revisados, con los obtenidos por nosotros sin entrar en distinciones entre paraganglios y ganglios.

En el nervio laríngeo superior la mayoría de los autores han descrito un sólo ganglio constante (Soulé y Bardier, 1907; Rubatelli, 1934; Ramaswany, 1963; Watzka, 1963; Ramaswany y Kulasekaran, 1974; Afifi, 1971; Barrios, 1977) para otros inconstante (Jansen y Netty-Marbell, 1967; Lawson y Zak, 1974) de gran volumen situado en la rama anterior del nervio laríngeo interno, con la excepción de un estudio en que se describe en esa posición una agrupación formada por un reguero de tres a cinco ganglios que denominan grupo tiroideo (Grynfelt y Hédon, 1908). Por otro lado, estos mismos autores describen una segunda agrupación ganglionar denominada aritenoepiglótico situada en la rama posterior a nivel del repliegue del mismo nombre (Grynfelt y Hédon, 1908). Esta segunda formación ganglionar también ha sido descrita por otros autores de forma constante (Rubatelli, 1934) o de forma inconstante como ganglios ectópicos situados sobre el borde superior del cartílago cricoides o por encima del músculo interaritenoideo (Lawson y Zak, 1974).

Nuestros resultados muestran que con relación a la rama interna del nervio laríngeo superior aparecen dos ganglios (Grynfelt y Hédon, 1908; Rubatelli, 1934; Lawson y Zak, 1974). Estas estructuras aparecen de forma constante (Grynfelt y Hédon, 1908; Rubatelli, 1934) y no de forma ocasional (Lawson y Zak, 1974), situadas la en la rama anterior y en la rama posteinferior del nervio. Nuestros resultados, al igual que la descripción realizada por todos los autores, muestran que el ganglio situado en la rama anterior es el de mayor volumen, lo que ha hecho que algunos autores lo consideren visible macroscópicamente (Ramaswany, 1963; Ramaswany y Kulasekaran, 1974), hecho que nosotros no hemos constatado ni siquiera con el uso de microscopio de disección a X2.5.

La mayoría de autores lo describen como una formación encapsulada (Rubatelli, 1934; Ramaswany, 1963; Watzka, 1963; Ramaswany y Kulasekaran, 1974; Jansen y Netty-Marbell, 1967; Zak y Lawson 1972; Lawson y Zak 1974) o compacta (Barrios, 1977), en nuestros resultados aparece de forma constante como una formación dispersa a lo largo de la rama A1 que se distribuye por el vestíbulo laríngeo. Esta morfología puede compararse a la descripción realizada por Grynfeldt y Hédon (1908) en la que lo describe como un grupo tiroideo integrada por un reguero de tres a cinco ganglios o al tipo difuso descrito por Barrios en fetos (Barrios, 1977).

El ganglio localizado en la rama posterior es de un volumen notablemente menor (Grynfeldt y Hédon, 1908; Rubatelli, 1934) asociado a la rama P1 que se distribuye por el repliegue aritenoepiglótico (Grynfeldt y Hédon, 1908; Rubatelli, 1934).

Además de estos dos ganglios constantes anteriormente mencionados nosotros observamos que existen de forma inconstante otras dos formaciones ganglionares asociadas a la rama S distribuida por el pliegue glosopiglótico y vallecula y a la rama P2 distribuida por el músculo interaritenoideo. Esta última formación se podría corresponder con los ganglios denominados ectópicos superiores (Lawson y Zak, 1974).

En el nervio recurrente diversos autores han descrito la existencia de un único ganglio situado, en su rama anterior sobre el músculo cricoaritenoideo lateral (Grynfeldt y Hédon, 1908), por detrás de la articulación cricotiroidea (Kleissansser, 1964; Barrios, 1977) o entre cricoides y primer anillo traqueal (Jansen y Netty-Marbell, 1967) o de forma variable por detrás de la articulación a veces en contacto con la glándula tiroidea, o entre el cricoides y

el primer anillo traqueal (Lawson y Zak, 1974). Sin embargo otros autores describen hasta tres ganglios situados, detrás, por debajo o por encima de la articulación circotiroidea algunas veces relacionadas también con la cápsula de la glándula tiroides (Sañudo y Doménech, 1990)

A diferencia de los anteriores autores nuestros resultados muestran que existen dos ganglios constantes asociados al nervio recurrente. El inferior localizado en el punto de división del nervio recurrente en sus ramas anterior y posterior (asa de Galeno) y el superior en la rama anterior entre las ramas para los músculos aritenosoide y cricoaritenosoide lateral. El ganglio localizado en relación con el extremo superior de la articulación cricotiroidea (Kleissansser, 1964; Barrios, 1977; Sañudo y Doménech, 1990) podría corresponderse con el ganglio superior descrito por nosotros situado en la rama anterior entre las ramas para el músculo aritenosoide y cricoaritenosoide lateral. Mientras que el ganglio descrito por nosotros en la bifurcación del nervio recurrente podría corresponderse con las descripciones que sitúan a este ganglio algo más inferior, entre el cricoide y primer anillo traqueal (Jansen y Nettey-Marbell, 1967; Lawson y Zak, 1974).

Además de estos dos ganglios constantes, observamos que existen de una forma inconstante células ganglionares dispersas en hasta tres localizaciones. Una asociada al músculo cricoaritenosoide lateral (2 casos), otro grupo de células ganglionares localizado en una de las ramas para el músculo cricoaritenosoide posterior (1 caso) y un tercer acumulo de células aparece localizadas en la rama para el músculo tiroaritenosoide (2 casos). La primera de estas pequeñas agrupaciones celulares y la de mayor número de células se

correspondería con la localización descrita para el ganglio laríngeo inferior por Grynfeldt y Hédon (1908).

Por otro lado estas pequeñas agrupaciones celulares presentes en los músculos hasta ahora solo se habían descrito en perros, asociados a los músculos tiroaritenosoide y cricoaritenosoide posterior (Geronzi, 1904) y entre las fibras musculares del resto de los músculos intrínsecos laríngeos (Hisa y col. 1996 a). Por tanto, estas células ganglionares presentes en los músculos de las laringes caninas se podrían corresponder con las descritas por nosotros en humanos.

Finalmente en relación con el nervio laríngeo externo también han sido descritas células ganglionares localizadas por delante del cono elástico (Lawson & Zak, 1974). Sin embargo, nuestros resultados no muestran tales formaciones.

Esta variabilidad en el número y en la localización no es única del hombre también se puede encontrar en otros animales mamíferos. En las laringes caninas se han descrito de 3 a 4 ganglios asociados a la rama interna del nervio laríngeo superior y al nervio recurrente (Geronzi, 1904; Grynfeldt y Hédon, 1907; Sugano, 1929; Lemer, 1932; Masuko y col., 1991; Shimazaki y col 1995; Hisa y col., 1996 c). A nivel de la rama interna del nervio laríngeo superior, se ha descrito diferentes localizaciones, en el punto de su ramificación (Sugano, 1929), a lo largo de su recorrido (Lemer, 1932) o bien formando agrupaciones ganglionares de 2 a 3 ganglios a nivel tiro-hioideo, ariteno-epiglótico (Grynfeldt y Hédon, 1907) y a nivel del espacio paraglótico (Shimazaki y col 1995; Hisa y col., 1996 c). A nivel del nervio recurrente en el punto donde se bifurca en sus ramas anterior y posterior (Sugano, 1929), a nivel del borde inferior del cartílago tiroideo

(Grynfeldt y Hédon, 1907) y dorsal al músculo cricoaritenideo posterior (Shimazaki y col 1995). También ha sido descrito a nivel del asa de Galeno (Grynfeldt y Hédon, 1907; Lemere ,1932).

En las laringes de gatos ha sido descrito también un número muy variable de ganglios. De 3 a 8 ganglios al nivel de la rama interna del nervio laríngeo superior que se distribuye por la cara interna del borde superior del cartílago tiroideo (Yoshida y col., 1993; Shimazaki y col., 1995). De 3 a 4 ganglios al nivel de las ramas que se distribuyen por la región del vestíbulo (Tsuda y col., 1992). De 2 a 6 ganglios situados dorsalmente al músculo cricoaritenideo posterior (Yoshida y col., 1993; Shimazaki y col., 1995) y de 1 a 3 ganglios en el nervio recurrente a su entrada a la laringe (Yoshida y col.,1993).

En las ratas los ganglios laríngeos aparecen asociados al nervio laríngeo superior en un número de 1 a 3, el mayor de ellos situado en la bifurcación de sus ramas interna y externa (Domeij y col.,1987). A nivel de la rama interna del nervio laríngeo superior se encuentran situados en la rama anterior que sigue la cara interna del cartílago tiroideo (Shimazaki y col., 1995; Hisa y col., 1996 b) y cerca de la articulación cricoaritenidea (Hisa y col., 1996 b). En relación con el nervio recurrente se han descrito de 1 a 4 ganglios (Dahlqvist y col., 1987) pero sólo uno de ellos es constante situado en relación con el cuerno inferior del cartílago tiroideo (Gorgas y Böck, 1976) otras veces algo más inferior, situado a unos 5-6 mm de la entrada del nervio a la laringe (Carlsöö y col., 1982). También se han descrito de 3 a 4 ganglios situados dorsolateralmente al músculo cricoaritenideo posterior (Simazaki y col., 1995).

5.3. TAMAÑO DE LOS GANGLIOS

De los ganglios constantes localizados en el NLI, el de mayor volumen que mide entre 0,1-0,3 mm de altura no es visible macroscópicamente aspecto que coincide con la mayoría de los autores (Afifi, 1971; Grynfeldt y Hédon 1908; Watz, 1963; Schömberger, 1969) y que discrepa de lo descrito por Ramaswamy (1963, 1974) que es él único en describir un ganglio macroscópico entorno a los 2-3 mm. En nuestro material siempre hemos encontrado de manera constante que este ganglio es el mayor de todos los presentes en la laringe mientras que para otros autores, es el ganglio asociado al nervio recurrente el de mayor tamaño (Lawson y Zak, 1974; Jansen y Netty-Marbell, 1967).

*"Si la estructura no nos cuenta algo sobre la función,
implica que no hemos observado correctamente"*

Szent-Györgyi

5.4. ESTUCTURA: ESTUDIO A MICROSCOPIA ÓPTICA

Una vez ya descrita el número y localización de los ganglios asociados a los nervios laringeos, pasaremos a hacer una descripción morfológica de estas estructuras porque algunos de estos datos nos arrojaran información sobre su posible naturaleza.

Las tinciones de impregnación argéntica realizadas en material humano (Afifi, 1971) y en laringes caninas (Lemere, 1932) mostraban la presencia de neuronas multipolares de un tamaño entre 20-25 um, y eran etiquetadas como células ganglionares parasimpáticas..

En los trabajos que se utilizó la tinción con Hematoxina-Eosina, los ganglios laringeos humanos se describían envueltos por una cápsula fibrosa en cuyo interior se distinguían dos tipos de células, unas de mayor tamaño que aparecían envueltas por un segundo tipo de células de mucho menor tamaño llamadas células satélite junto, a un gran número de fibras mielínicas y amielínicas (Lawson & Zak 1974; Dahlqvist y col 1986 b; Ramaswamy y col 1994). Adicionalmente algunos autores describían la presencia de capilares (Lawson & Zak 1974; Dahlqvist y col 1986 b). En los trabajos realizados en animales de experimentación (gatos, perros y ratas), las tinciones de Hematoxina-eosina (H-E) y de azul de toluidina mostraban también ganglios encapsulados en cuyo interior se encontraban células ganglionares que median entre 25-30 um envueltas por células de menor tamaño y entre ellas aparecían

números capilares (Yoshida y col., 1993; Tanaka y col., 1993 b; Shimazaki y col., 1995).

En nuestro estudio, y aún cuando la tinción empleada es la H-E, los resultados obtenidos parecen abundar sobre la naturaleza autonómica de los ganglios, y concretamente sobre su naturaleza parasimpática. Las células ganglionares son de pequeño tamaño y sus cuerpos celulares tienen formas irregulares. Esto habla a favor de que se trate de neuronas multipolares, con núcleo excéntrico y rodeadas en ocasiones por cápsula como en el caso de los ganglios asociados al nervio recurrente aunque en otras ocasiones aparezcan como células ganglionares dispersas entre las fibras nerviosas como en el caso del ganglio presente en la rama anterior del nervio laríngeo superior interno. Por otro lado, a diferencia de las descripciones que se realizan en los paraganglios de abundantes e importantes redes de capilares y sinusoides distribuidos entre las células ganglionares, en nuestras muestras no observamos la presencia de tales elementos vasculares.

Mediante el análisis de la ultraestructura a microscopía electrónica Ramaswamy y col. (1994) describieron la presencia de, dos tipos de vesículas en el interior de las células ganglionares, dos tipos de sinapsis aferentes y eferentes así como la presencia de capilares. Datos que se vienen a semejar a los descritos en los trabajos realizados por el grupo sueco sobre la ultraestructura de los paraganglios de la rata (Carlsöö y col., 1982, 1983; Dahlqvist y col., 1984, 1987, 1991; Domeij y col., 1987). En nuestro caso no disponemos de los datos que proporciona la microscopía electrónica por problemas derivados de la elevada dificultad técnica que presenta la realización de este tipo de estudio.

Por tanto, con los datos que nos proporciona la tinción con H-E no somos capaces de observar la existencia de paraganglios y nos inclinamos a considerar a estas estructuras como ganglios autónomos.

Estos ganglios por su localización, en las ramas de los nervios laringeos y por sus características morfológicas, células multipolares de núcleo excéntrico, tendrían por tanto una naturaleza autonómica parasimpática (Lemere 1932; Afifi 1971; Ramaswamy 1963,1974, 1994; Barrios 1977; Shimazaki y col., 1995).

5.5. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO SOBRE LA NATURALEZA DE LOS GANGLIOS.

La ausencia de datos en referencia a la ultraestructural hace que la morfología en este caso proporcione escasa información sobre la naturaleza autonómica versus paraganglionar. Para suplirla hemos realizado un estudio inmunohistoquímico donde los avances en este terreno han facilitado considerablemente el estudio de la naturaleza de las estructuras paraganglionares y/o ganglionares presentes en los nervios laríngeos.

5.5.1. Cromogranina A (Cr. A)

El paraganglio expresa una gran cantidad de marcadores de los cuales tiene especial valor los anticuerpos anticromogranina A.

La cromogranina A es una proteína cuya función es desconocida pero que está presente en todos los paraganglios. Por tanto se puede usar como un marcador para la detección de células neurosecretoras en el sistema paraganglionar (Tischler 1997).

Los anticuerpos frente a la Cr. A no han sido utilizados como marcadores de células neurosecretoras en el estudio de los paraganglios laríngeos en animales de experimentación, pero sí en humanos (Frigo y col., 1989), donde además también han sido utilizados como marcadores de este tipo de células en los paragangliomas laríngeos (Martinez-Madrigal y col., 1991; Salim y col., 1993) así como en los paraganglios presentes en la vejiga urinaria (Honma, 1994) y en la vesícula biliar (Kawabata 1999). Además en humanos también se ha utilizado como marcador de células neurosecretoras en otras partes de la vía respiratoria superior, como la mucosa nasal y la mucosa del paladar, donde se observaron un número de células cromograninas positivas en la porción

distal y ductus de las glándulas presentes a dichos niveles (Albegger y col., 1991).

En el único trabajo realizado sobre ganglios laríngeos humanos no se demostró inmunorreactividad en ninguna de las células para la Cr. A (Frigo y col., 1989). Sin embargo, en nuestro estudio en cuatro de los cinco ganglios presentes en el NLI encontramos un pequeño grupo de células que mostraban una clara positividad para la cromogranina A. Mientras que en el recurrente encontramos en cuatro de los siete ganglios analizados un grupo muy reducido de células que mostraban una positividad pero de menor intensidad que la observada en las células del ganglio laríngeo superior. En función de estos resultados podríamos considerar que algunas de las células presentes en el NLI y en el NR son células neurosecretoras en cuyo citoplasma posiblemente se encuentren vesículas densas (dense-cored vesicle, DCV) donde se localizaría entre otros productos de neurosecreción, la cromogranina A .

Por tanto, se podría considerar que aunque la morfología de los dos ganglios principales asociados al NLI y al NR, no se corresponda con la de un paraganglio, la presencia de células CrA positivas en su interior habla de que estos ganglios podrían contener un número de células que se comportarían como estructuras neurosecretoras y, por tanto, formarían parte del sistema APUD o del sistema neuroendocrino difuso

5.5.2. Neurotransmisores

Tirosina hidroxilasa

Gorgas y Böck (1976) fueron los primeros que valiéndose del método de la fluorescencia inducida por el formaldeído demostraron la presencia de catecolaminas en el interior de los paraganglios presentes en los ratones.

La principal catecolamina acumulada es la Dopamina y en una importante menor proporción la Noradrenalina (Dahlqvist y col 1986 a, 1989 a, Dahlqvist y Forsgren 1992 a).

La identificación de las enzimas involucradas en la síntesis de las catecolaminas es una forma indirecta para permitir identificar las catecolaminas presentes en las estructuras nerviosas. La primera enzima involucrada es la tirosina hidroxilasa (TH) la cual constituye la enzima limitante en la síntesis de las catecolaminas (Dahlqvist y Forsgren, 1992 a) y, por tanto, se encuentra en todas las células productoras de catecolaminas, mientras que la dopamina- β -hidroxilasa (DBH) sólo se encuentra en las células que producen norepinefrina y la fenil-etanolamina-N-metiltransferasa (PNMT) en las que producen epinefrina (Tischler, 1997).

La ventaja de la utilización de estos anticuerpos sobre los métodos de fluorescencia que detectan directamente la presencia de catecolaminas es que estos últimos sólo son factibles realizarlos en material fresco mientras que los primeros pueden realizarse sobre el material incluido en parafina y además permiten identificar el tipo de catecolamina presente en la estructura nerviosa (Tischler, 1997). Por tanto, ha sido uno de los más importantes avances en el estudio de los paraganglios.

En las células tipo I de los paraganglios laríngeos de las ratas se observó una marcada positividad para la TH (Dahlqvist y Forsgren, 1992 a; Dahlqvist y col., 1992 b, 1994; Lidegran y col., 1995). Sin embargo, en las células ganglionares autónomas intralaríngeas de las ratas (Domeij y col., 1991 a; Dahlqvist y Forsgren, 1992 a) y de los perros (Masuko y col., 1991) presentaron una inmunorreactividad negativa para la TH, aunque en los gatos se pudo observar alguna célula positiva para la TH (Yoshida y col., 1993).

En nuestro caso encontramos en todos los ganglios asociados a la rama A1 del NLI, una pequeña población de células inmunorreactivas para la TH. Mientras que, en cuatro de los siete ganglios asociados al NR se encontró un número más reducido de células en las que, comparándolas con las del NLI mostraban una menor intensidad en su positividad para la TH.

Por tanto, la positividad de estas células indican que tienen la capacidad de sintetizar catecolaminas y en especial dopamina.

Como señalamos en el apartado de material y métodos las tinciones de inmunohistoquímica se realizaron sobre cortes seriados consecutivos, hecho que nos ha permitido comparar posteriormente en la pantalla del ordenador las diferentes imágenes obtenidas. Observando las preparaciones consecutivas del mismo ganglio para la Cr A y para la TH parece que las células positivas para la Cr A y para la TH sean las mismas (Figura 4.24) y que, por tanto, se podría tratar de células neurosecretoras sintetizadoras de catecolaminas aunque la falta de estudios de co-localización no nos permita confirmarlo.

Acetilcolina transferasa (ChAT).

El mejor marcador que se ha demostrado para el sistema colinérgico es la acetilcolina transferasa (ChAT). Sin embargo posiblemente por una diferencia en la estructura molecular entre la ChAT del sistema nervioso central y la del sistema periférico, los anticuerpos existentes a veces fallan en el marcaje de la ChAT periférica. Recientemente Tooyama y Kimura (2000) han sido capaces de clonar un marcador específico para la acetil colinatransferasa periférica (pChAT) a partir del cDNA del ganglio pterigopalatino de la rata. Utilizando este marcador se ha podido demostrar en ratas, la positividad para la pChAT en las células ganglionares autonómicas presentes en los nervios laringeos (Nakanishi y col., 1999).

Por otro lado, estudios inmunohistoquímicos en ratas (Domeij y col., 1991 a, d; Dahlqvist y Forsgren, 1992 a; Lidegran y col., 1995) y gatos (Yoshida y col. 1993) demostraron la presencia de acetilcolinesterasa (AChE) en el interior de las células ganglionares. Dado que la AChE es un enzima involucrado en la síntesis de acetil-colina contribuía a apoyar la naturaleza parasimpática de estas estructuras. Sin embargo, esto a de ser tomado con cierta cautela. Ya que, en estudios de doble marcaje para la pChAT y la AChE han demostrado, que si bien la mayoría de las células mostraban una positividad para las dos enzimas, existía un número reducido de células que únicamente mostraba una positividad para la AChE (Nakanishi y col., 1999). Esta observación viene a apoyar la idea que la AChE no es un marcador específico para las estructuras colinérgicas ya que al parecer una reacción AChE positiva no está únicamente confinada a dichas estructuras nerviosas (Domeij y col 1991 a).

En las células paraganglionares del cuerpo carotídeo del gato (Ballard y Jones, 1972) y de la rata (Korkala y Warris, 1977) también se ha descrito la presencia de ChAT, dentro del citoplasma de las células cromafines o células tipo I especialmente, en el interior de las vesículas densas (dense-cored vesicle, DCV), por lo que parece que la acetilcolina es también sintetizado en estas células.

En nuestro estudio utilizamos un antisuero ChAT extraído de cabra ya que el nuevo antisuero pChAT no lo encontramos disponible en el mercado. Encontramos en todos los ganglios estudiados asociados a la rama interna del NLI como a los del NR un número reducido de células que mostraban en su citoplasma una débil positividad para la ChAT. Comparamos los cortes seriados de cada ganglio para la Cr A, la TH y para la ChAT sin observar que existiera una correlación entre las células positivas para la TH y ChAT ni entre las positivas para la cromogranina A y la ChAT. Por tanto, parece que estas células no se corresponden con las células principales o neurosecretoras si no que parecen ser células ganglionares autonómicas de naturaleza parasimpática. De manera que, tendríamos dos grupos de células diferentes, unas que presentan inmunorreactividad positiva para la cromogranina A que además parecen ser las mismas que presentan positividad para la TH y otro grupo de neuronas que siendo negativas para estos dos anteriores marcadores, sin embargo, son positivas para la ChAT. Estos resultados nos llevarían a la conclusión de que en estas estructuras coexisten dos tipos de células, unas de naturaleza neurosecretora y otras de naturaleza autonómica presumiblemente parasimpática.

5.5.2. Neuroreguladores: Neuropeptidos

VIP

Este neuropeptido se ha descrito distribuido en el interior de las células ganglionares autónomas presentes en las laringes de los perros (Masuko y col., 1991) ratas (Dahlqvist y col., 1989 b; Domeij y col., 1991 a; Lidegran y col., 1995) y gatos (Tsuda y col., 1992; Yoshida y col., 1993; Tanaka y col., 1993 b). En estos últimos, también se ha observado la presencia de fibras VIP positivas rodeando a las células ganglionares (Tsuda y col., 1992). En muchos trabajos se ha descrito como el neuropeptido más abundante tanto en el interior de las células como en las redes nerviosas (Masuko y col 1991; Tsuda y col 1992; Tanaka y col 1993 b; Yoshida y col 1993). Aunque, en humanos no existan estudios sobre la distribución de este neuropeptido en los ganglios laríngeos, si se ha observado inmunorreactividad positiva para el VIP, en el interior de las células ganglionares autónomas en los ganglios bronquiales y traqueales (Luts y col., 1993).

En el interior de las células tipo I de los paraganglios laringeos de las ratas no se ha observado inmunorreactividad para este neuropéptido (Dahlqvist y col., 1989 b, 1990, 1994). Sin embargo, estas células aparecen rodeadas por una red de fibras nerviosas que entre otros neuropeptidos presentaban positividad para el VIP (Dahlqvist y col 1989 b, 1990, 1992 b, 1994; Lidegran y col 1995).

En nuestro trabajo encontramos que en dos de los cuatro ganglios asociados a el NLI y en dos de los tres asociados al NR existían células dispersas positivas para el VIP y que alguna de estas células mostraba también un marcaje pericelular lo que implicaba que además algunas de ellas recibían una

inervación de fibras VIP positivas. Al igual que ocurría en los ganglios autónomos procedentes de larínges caninas y de gatos (Masuko y col 1991; Tsuda y col 1992; Tanaka y col 1993 b; Yoshida y col 1993), en nuestro material humano, hemos encontrado que es el neuropeptido más abundante.

En estudios de doble marcaje se observó que este neuropeptido coexiste en el interior de algunas de las células ganglionares, especialmente con el NP-Y y en menor proporción con la SP y la ENK (Masuko y col., 1991; Domeij y col., 1991 a; Tsuda y col., 1992). Nosotros no hemos realizado estos estudios de doble marcaje pero, la observación en la pantalla del ordenador de los cortes seriados consecutivos, no nos ha permitido establecer tal coexistencia aunque, tal extremo ha de ser tomado con cautela pues son únicamente los estudios de doble marcaje los que pueden inequívocamente confirmar este hecho.

El VIP ha sido descrito en las células ganglionares localizadas en el ganglio nodoso del vago (Dahlqvist y Forsgren, 1989 b; Dahlqvist y col., 1990), distribuido a lo largo de las fibras colinérgicas (Domeij y col., 1991 a; Kummer y col., 1992; Tanaka y col., 1995) y en el interior de ganglios parasimpáticos como el esfenopalatino, ciliar, ótico submandibular etc., (Tsuda y col., 1992) por tanto es un neuropeptido vinculado clásicamente al sistema parasimpático. Este hecho es un factor que viene a apoyar el carácter autonómico parasimpático de algunas de las células presentes en estas estructuras (Masuko y col 1991; Domeij y col., 1991 a; Tsuda y col 1992; Yoshida y col., 1993; Dahlqvist y col 1994; Lidegran y col 1995).

NP Y

Como el anterior neuropeptido también ha sido descrito aunque en menor proporción, en el interior de las células de los ganglios autónomos presentes en las laringes de los gatos (Tsuda y col., 1992; Yoshida y col., 1993; Tanaka y col., 1993 b), perros (Masuko y col., 1991) y ratas (Dahlqvist y col., 1989 b; Domeij y col., 1991 a; Lidegran y col 1995). En las redes nerviosas que se encuentran rodeando a estas células ganglionares también ha sido detectada inmunorreactividad para este neuropéptido (Dahlqvist y col., 1989 b; Tsuda y col., 1992; Tanaka y col., 1993 b).

En el interior de las células tipo I de los paraganglios laríngeos no se ha podido determinar la presencia de positividad para el NP-Y (Dahlqvist y col., 1989 b, 1990, 1992 b, 1994). Sin embargo, a nivel de la numerosa red de fibras nerviosas que rodean a las células paraganglionares si se ha podido detectar una inmunorreactividad positiva para este neuropéptido (Dahlqvist y col 1989 b, 1990, 1992 b, 1994; Lidegran y col 1995).

En nuestro trabajo observamos una escasa positividad en dos de los tres ganglios presentes en el NLI. Sin embargo, en el único ganglio estudiado asociado al NR el número de células fue algo más superior y se podía apreciar también un claro marcaje pericelular tal como se describía en la periferia de las células ganglionares autonómicas en algunos animales de experimentación (Dahlqvist y col., 1989 b; Tsuda y col., 1992; Tanaka y col., 1993 b).

Una interpretación simplista de estos resultados nos conduciría a considerar a estas células y fibras positivas para el NP-Y, como simpáticas, ya que este neuropéptido es considerado clásicamente simpático. Sin embargo, no hemos de perder de vista los estudios de doble marcaje realizado en la laringe donde

este neuropeptido se ha descrito coexpresado junto a el VIP y la acetilcolina (Domeij y col., 1991 a). Como ya señalamos al referirnos al VIP, la falta de este tipo de estudios en nuestro trabajo, no nos permite ser concluyentes en cuanto al posible papel que puede desempeñar el NP-Y en estas estructuras, aunque con toda probabilidad venga a apoyar la presencia de células autonómicas parasimpáticas

SUSTANCIA P

La mayoría de los trabajos realizados en diferentes animales de experimentación coinciden en señalar que tan sólo existe un escaso número de células ganglionares autonómicas positivas para la SP (Masuko y col., 1991; Tsuda y col., 1992; Tanaka y col., 1993 b; Yoshida y col., 1993) o bien como sucede en las ratas una ausencia total de células inmunorreactivas para la SP (Dahlqvist y col., 1989 b; Domeij y col., 1991 b; Lidegran y col., 1995). En referencia a las fibras nerviosas que rodean a las celulas ganglionares se ha observado también una escasísima positividad para la SP (Masuko y col., 1991; Tsuda y col., 1992; Yoshida y col., 1993).

Sin embargo, ha sido el único neuropeptido que si se ha podido detectar en el interior de las células paraganglionares laríngeas de la rata (Dahlqvist y col 1990). Esta inmunoreactividad se veía intensificada tras la exposición a la hipoxia (Dahlqvist y col 1992 b) o tras la exposición a la irradiación (Lidegran y col 1995). En las fibras nerviosas que se encuentran rodeando a las células paraganglionares apenas también se ha podido detectarse alguna positividad para la SP (Dahlqvist y col 1989 b; Lidegran y col 1995).

En nuestras muestras, tanto en el ganglio asociado al NLI como el asociado al NR se encontraron de 1 a 2 células que mostraban una dudosa positividad en

su citoplasma para este neuropeptido, mientras que no encontramos ninguna fibra nerviosa inmunorreactiva para la SP que rodeara a las células ganglionares. Quizá esto pueda ser debido a la baja concentración en que se encuentre este neuropéptido en el interior de estas estructuras, hecho que le hace ser indetectable por la técnica empleada en nuestro estudio. La SP que se ha descrito co-expresada junto al VIP en las células ganglionares presentes en las laringes de los gatos (Tsuda y col., 1992) viene también a apoyar la naturaleza parasimpática de estas células.

CGRP

En el citoplasma de las células ganglionares autonómicas presentes en las laringes de los perros (Masuko y col., 1991), ratas (Dahlqvist y col., 1989 b; Domeij y col., 1991 b; Lidegran y col., 1995) y gatos (Tsuda y col., 1992; Yoshida y col., 1993), no se evidencia positividad alguna para el CGRP. En algún trabajo realizado en gatos, sin embargo, si se ha podido observar en un número muy reducido de células una débil positividad para este neuropéptido (Tanaka y col., 1993 b). En las redes de fibras nerviosas que rodean a estas células ganglionares en los gatos (Tsuda y col., 1992; Yoshida y col., 1993) y en los perros (Masuko y col., 1991) se ha demostrado una llamativa inmunorreactividad para el CGRP. Estas fibras nerviosas supuestamente ejercen una regulación sináptica sobre las células ganglionares a las que rodean (Tsuda y col 1992).

Tampoco se ha podido demostrar la presencia de CGRP en el interior de las células paraganglionares laríngeas de las ratas (Dahlqvist 1992 b). Sin embargo, como también ocurría con las células ganglionares autonómicas en las redes nerviosas que rodean a las células paraganglionares se ha descrito

una inmunorreactividad positiva para el CGRP pero en una menor proporción que la descrita en las fibras que rodean a las células ganglionares (Dahlqvist y col 1989 b, 1990, 1994; Lidegran y col 1995).

En nuestro caso la inmunorreactividad para el CGRP presente tanto en las células como en las fibras nerviosas periféricas resultó negativa.

Posiblemente lo que suceda es que este neuropeptido esté presente en concentraciones muy bajas que le hagan prácticamente indetectables (Masuko y col., 1991) al igual que habíamos señalado con la sustancia P.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

PRIMERA. No hemos observado ganglios en el nervio laríngeo externo. Sin embargo, en la rama distribuida por el vestíbulo laríngeo y la dirigida hacia el cartílago aritenoideo, de los nervios laríngeos internos existen dos pares constantes de ganglios (derecho e izquierdo), siendo el de mayor volumen el localizado en la rama distribuida por el vestíbulo laríngeo. En los nervios recurrentes también se encuentran de manera constante dos pares de ganglios (derecho izquierdo) localizados, uno, en el punto de división en sus ramas terminales anterior y posterior y el otro, en el trayecto de la rama terminal anterior, de los cuales el primero es el de mayor volumen.

SEGUNDA. La localización de los ganglios situados en la rama anterior del NLI distribuida por el vestíbulo laríngeo y en la rama anterior del NR se corresponde con la descrita como paraganglios laríngeos superior e inferior respectivamente.

TERCERA. También existe, en relación con los nervios laríngeos, un variado número de pequeños ganglios inconstantes, a veces de tan solo 3 a 5 células, distribuidos por las ramas colaterales distribuidas por la vallécula y pliegue glosopiglótico y la dirigida hacia el músculo aritenoideo, del nervio laríngeo interno y por las ramas musculares del recurrente destinadas a los músculos tiroaritenoideo, cricoaritenoideo lateral y cricoaritenoideo posterior.

CUARTA. La morfología a microscopía óptica de los ganglios, constantes e inconstantes, se corresponde a la de ganglios del sistema nervioso autónomo y no a la de paraganglios. En el supuesto paraganglio laringeo superior las células no están encapsuladas sino dispersas a lo largo y entre las fibras nerviosas.

QUINTA. En los supuestos paraganglios/ganglios laringeos superior e inferior existe una pequeña agrupación de células inmunoreactivas para la cromogranina A.

SEXTA. En los supuestos paraganglios/ganglios laringeos superior e inferior existen otras dos pequeñas agrupaciones celulares que presentan inmunoreactividad para la tiroxina hidroxilasa y la acetilcolina transferasa.

SÉPTIMA. Algunas neuronas dispersas de los denominados paraganglios/ganglios laringeos superiores e inferiores presentan una inmunorreactividad positiva para el VIP, NPY y SP, mientras que no existe ninguna neurona que muestre inmunorreactividad para el CGRP.

NOVENA. En los denominados paraganglios/ganglios laringeos superior e inferior, la inmunoreactividad para los neurotransmisores y neuromodulares no mostró colocación celular, quedando muchas células de los mismos sin ninguna inmunoreactivas para los anticuerpos empleados.

DECIMA. Aún cuando la morfología de los supuestos paraganglios/ganglios laringeos superiores e inferiores no se corresponde con la descrita para los paraganglios laringeos, el estudio inmunohistoquímico nos permite sugerir que en ellos coexisten dos tipos de células. De un lado un número de células cromograninas positivas y por tanto células neurosecretoras que probablemente secreten dopamina junto a otro grupo de células autonómicas parasimpáticas.

7.BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

AFIFI A.B. 1971. The human epiglottis and its innervation. Arch. Anat. Hist. Embr. 54: 161-172.

ALBEGGER K., HAUSER-KRONBERGER C., SARIA A., GRAF A-H., BERNATZKY G., HACKER G.W., 1991 Regulatory Peptides and General Neuroendocrine Markers in Human Nasal Mucosa, Soft Palate and Larynx. Acta Otolaryngol (Stockh) 111: 373-378.

AMARA S.G., JONAS V., ROSENFELD M.G., ONG E.S., EVANS R.M. 1982 Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. Nature 298:240-244

ANDREWS A.H., 1955 Glomus Tumor (Non-Chromaffin Paraganglioma) of the Larynx: Case Report. Ann. Otol. 64:1034-1036.

ANICHKOV SV., & BELEN'KII ML., 1963 Pharmacology of the carotid body chemoreceptors. New York. Macmillan.

BALLARD K.J., & JONES J. V., 1972 Demonstration of Choline Acetyltransferase activity in the carotid body of the cat. J. Physiol (Lond) 227:87-94

BARRIOS JM., PUERTA AJ., RIBES R., 1977 Acúmulos neuronales en los nervios laríngeos. Anales del desarrollo Vol 21 N° 50: 41-44

BASTERRA J., DILLY P.N., MARTORELL M.A., 1989 The autonomic innervation of the human vocal cord: Neuropeptides. Laryngoscope 99 March: 293-296.

BELVISI MG., STRETTON D., BARNES P.J., 1991 Nitric oxide as an endogenous modulator of cholinergic neurotransmission in guinea-pig airways European Journal of Pharmacology 198: 219-221.

BERRY M., BANNISTER L.H., STANDRING S.M. 1995 Nervous system. Carotid body. En Williams P.L., BANNISTER L.H., BERRY M.M., COLLINS P., DYSON M., DUSSEK J.E., FERGUSON M.W.J., (editores). Gray's Anatomy 38^a edición. Editado en New York: Churchill Livingstone p972-973.

BLANCHARD C. L., Y SAUNDERS W. H., 1955. Chemodectoma of the larynx. Arch. Oto-laryngol. 61: 472-474.

BÖCK PETER 1982 The Paraganglia. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York.

BROWNLEE R.E., & SHOCKLEY W.W., 1992 Thyroid Paraganglioma. Ann Otol Rhinol Laryngol 101: 293-299.

CADIEUX A., SPRINGALL D.R., MULDERY P.K., RODRIGO J., GHATEI M.A., TERENGI G., BLOOM S.R., POLAK J.M., 1986 Occurrence, distribution and ontogeny of CGRP immunoreactivity in the rat lower respiratory tract: effect of capsaicin treatment and surgical denervations. Neuroscience Vol 19 N° 2: 605-627.

CARLSÖÖ B., DOMEIJ S., HELLSTRÖM S., DEDO HH., IZDEBSKI K., 1982 An endoneural microglomus of the recurrent laryngeal nerve. Acta otolaryngol, Suppl. 386 :184-186

CARLSÖÖ B., DAHLQVIST A., DOMEIJ S., HELLSTRÖM S., DEDO H.H., IZDEBSKI K., 1983 Carotid-body-like tissue within the recurrent laryngeal nerve: an endoneural chemosensitive micro-organ? Am. J. Otolaryngol. 4: 334-341

CATTORETTI G., SUURMEIJER A.J.H., 1995 Antigen unmasking on formalin-fixed paraffin-embedded tissues using microwaves: a review. *Adv Anat Pathol.* 2:2-9

CHIEN C.L., CHAU Y.P., LU K.S., 1991 Ultrastructural studies on the barrier properties of the paraganglia in the rat recurrent laryngeal nerve. *Acta Anat* 141: 262-268

COUPLAND 1965 referido por Dyson 1995

DAHLQVIST A., CARLSÖÖ B., DOMEIJ S., HELLSTRÖM S., 1984 Morphometric analysis of glomus cells within the recurrent laryngeal nerve of the rat. *Journal of neurocytology* 13: 407-416

DAHLQVIST A., PEQUIGNOT J-M., HELLSTRÖM S., CARLSÖÖ B., PEYRIN L., 1986 a. Catecholamines of Endoneurial Laryngeal Paraganglia in the Rat. *Acta Physiol Scand* 127:257-261

DAHLQVIST A., CARLSÖÖ B., HELLSTRÖM S., 1986 b Paraganglia of the human recurrent laryngeal nerve. *Am J Otolaryngol* 7: 366-369

DAHLQVIST A., CARLSÖÖ B., HELLSTRÖM S., DOMEIJ S., KOURTOPOULOS H., 1986 c. Fiber Composition of the Recurrent Laryngeal Nerve after experimental Vagotomy and Sympathectomy. *Acta Anat* 125: 114-120

DAHLQVIST A., 1986 d Recurrent laryngeal nerve and its paraganglia. A structural and biochemical study. *Umea University Medical Dissertations. New Series. N° 164 (Umea University, Umea, 1986)*

DAHLQVIST A., HELLSTRÖM S., CARLSÖÖ B., PEQUIGNOT J-M. 1987. Paraganglia of the rat recurrent laryngeal nerve after long-term hypoxia: a morphometric and biochemical study. *Journal of Neurocytology* 16:289-297

DAHLQVIST A., PEQUIGNOT J-M., HELLSTRÖM S., 1989 a. Sympathectomy provides evidence of dopamine storage in rat laryngeal nerve paraganglia. *Acta Physiol. Scand* 135: 189-195

DAHLQVIST A., FORSGREN S., 1989 b. Networks of peptide-containing Nerve Fibres in Laryngeal Nerve Paraganglia. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 107: 289-295

DAHLQVIST A., FORSGREN S., HELLSTRÖM S., PEQUIGNOT J-M., 1990. Neurotransmitters in Laryngeal Nerve Paraganglia: A Morphological and Biochemical Study. En: Eyzagurre C., Fidone S.J., Fitzgerald R.S., Lahiri S., McDonald D.M., editores. *Arterial Chemoreception*. New York: Springer-Verlag. p 419 – 424.

DAHLQVIST A., PEQUIGNOT J.M., HELLSTRÖM S., 1991 Laryngeal nerve paraganglia of the rat are morphologically and biochemically unchanged by long-term hypercapnia. *Neuroscience Letters* 134: 25-28

DAHLQVIST A., FORSGREN S., 1992 a Expression of the catecholamine-synthesizing enzymes in paraganglionic and ganglionic cells in the laryngeal nerves of the rat. *Journal of neurocytology* 21: 1-6.

DAHLQVIST A., FORSGREN S., HELLSTRÖM S., 1992 b Long-term hypoxia induces changes in the substance P immunoreactivity pattern in laryngeal nerve paraganglia. *Acta otolaryngol (Stockh)* 112: 726-733

DAHLQVIST A., NEUHUBER W.L., FORSGREN S., 1994 Innervation of laryngeal nerve paraganglia: an anterograde tracing and immunohistochemical study in the rat. *The journal of comparative neurology* 345: 440-446

DE CASTRO F., 1928 Sur la structure et l'innervation du sinus carotidien de l'homme et des mammifères. Nouveaux faits sur l'innervation et la fonction du glomus caroticum. Travaux de Laboratoire de Recherches Biologiques de l'Université de Madrid 25: 330-80.

DILWORTH T.F.M., 1921 The nerves of the human larynx. Journal of Anatomy 22: 48-52

DOMEIJ S., CARLSÖÖ B., DAHLQVIST A., HELLSTRÖM S., 1987 Paraganglia of the superior laryngeal nerve of the rat. Acta anat. 130: 219-223.

DOMEIJ S., DAHLQVIST A., FORSGREN S., 1991 a Studies on colocalization of neuropeptide Y, vasoactive intestinal polypeptide, catecholamine-synthesizing enzymes and acetylcholinesterase in the larynx of the rat. Cell tissue Res 263:495-505

DOMEIJ S., DAHLQVIST A., FORSGREN S., 1991 b Regional differences in the distribution of nerve fibers showing substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the rat larynx. Anat. Embryol. 183: 49-56

DOMEIJ S., DAHLQVIST A., FORSGREN S., 1991c Enkephalin-like immunoreactivity in ganglionic cells in the larynx and superior cervical ganglion of the rat. Regul Pept 32:95-107.

DOMEIJ S., CARLSÖÖ B., DAHLQVIST A., FORSGREN S., 1991d Occurrence of Mast Cells to the Distribution of Nerve Fibers in the Rat Larynx. Acta Otolaryngol (Stockh). 111: 981-989.

DYSON M., 1995 Endocrine system. Paraganglia En Williams P.L., BANNISTER L.H., BERRY M.M., COLLINS P., DYSON M., DUSSEK J.E., FERGUSON M.W.J., (editores). Gray's Anatomy 38ª edición. Editado en New York: Churchill Livingstone p1905-1907.

EKBLAD E., HAKANSSON R., SUNDLER F., 1984 VIP and PHI coexist with an NPY-like peptide in intramural neurones of the small intestine. Regul Pept 10: 47-55

ERÄNKÖ O., & HÄRKÖNEN M., 1963 Histochemical demonstration of fluorogenic amines in the cytoplasm of sympathetic ganglion cells of the rat. Acta physiol scand 58: 285-286.

ERÄNKÖ O., & HÄRKÖNEN M., 1965 Monoamine containing small cells in the superior cervical ganglion of the rat and an organ composed of them. Acta physiol scand 63: 511-512

FALINI B., & TAYLOR C.R., 1983 New developments in immunoperoxidase techniques and their application. Arch. Pathol. Lab. Med. 107:105-117

FRIGO B., BARBARESCHI M., MARISCOTTI C., MOTTA M., FELISATI G., PIGNATARO L., MANGHISI V., 1989. Substance P-like immunoreactive nerve fibers of the human laryngeal mucosa. Preliminary report. Ital.J. Neurol. Sci. 10: 69-72.

FUJITA T., 1976 The gastro-enteric endocrine cell and its paraneuronic nature. En: Coupland RE. Fujita T. Editores. Chromaffin, enterochromaffin and related cells. Amsterdam Oxford New York: Elsevier Sci Publ Co p 191-208.

FUJITA T. KOBAYASHI S. 1979 Current views on the paraneuron concept. Trends in Neurosci 2: 27-30.

GARCIA DEL MORAL R. 1993 Técnicas de inmunohistoquímica (II). Laboratorio de Anatomía Patológica. Interamericana de España. McCrawhill. 341-365

GENESER F., 1987 Histología. Métodos histológicos. Buenos Aires: Médica Panamericana p: 44-72

GERONZI G 1904 Sur la présence de ganglions nerveux intra-musculaires dans certains muscles intrinsèques du larynx, première note. Arch de laryngol 6: 854-865

GLENNER GG., GRIMLEY PM., 1974 Tumors of the extra-adrenal paraganglion system (including chemoreceptors). En: Firminger H.I. editor Washington: Armed Forces Institute of Pathology.

GONZALEZ C., LOPEZ-LOPEZ JR., OBESO A., PEREZ-GARCIA MT., ROCHER A., 1995 Cellular mechanisms of oxygen chemoreception in the carotid body. Respiration Physiology 102:137-147.

GOOGE P.B., FERRY J.A., BHAN A.K., DICKERSIN G.R., PILCH B.Z., GOODMAN M., 1988 A comparison of Paraganglioma, Carcinoid tumor, and Small-cell Carcinoma of the larynx. Arch Pathol Lab Med 112:809-815

GORGAS K., BÖCK P., 1976 Formaldehyde Induced Catecholamine Fluorescence in the Mouse Inferior Laryngeal Paraganglion. Cell. Tiss. Res. 173: 139-142

GRILLO M.A., JACOBS L., COMROE J.H., 1974 A combined fluorescence histochemical and electron microscopic method for studying special monoamine-containing cells (SIF cells). J Comp Neurol 153:1-14.

GRUBER H. 1981 General Methods in Light Microscopy of the Nervous System. En Heym C.H & Forssman W.G.: Techniques in neuroanatomical research. Berlin: Springer.

GRUNDITZ T. EKMAN R. HAKANSSON R. SUNDLER F. UDDMAN R. 1988 Neuropeptide Y and vasoactive intestinal peptide coexist in rat thyroid nerve fibers emanating from the thyroid ganglion. Regul Pept 23:193-208.

GRYNFELTT E., et HEDÓN E., 1907 Recherches anatomiques sur les ganglions nerveux du larynx chez le chien. Arch. Intern. de laryngol. 24, 835-846.

GRYNFELT E., et HEDÓN E., 1908 Sur les ganglion nerveux du nerfs laryngés chez l'homme. Soc. des sciences Médicales de Montpellier 26, 348-351.

GUILD SR., 1953 The glomus jugulare, a non-chromaffin paraganglion in man. Ann Otol Rhinol Laryngol. 62: 1045-1071

HAUSER-KRONBERGER C., ALBEGGER K., SARIA A., HACKER G.W., 1993 Regulatory peptides in the human Larynx and recurrent nerves. Acta otolaryngol (Stockh) 113: 409-413

HELLSTRÖM S., 1975 Morphometric studies of dense-cored vesicles in Type I cells of rat carotid body. Journal of Neurocytology 4: 77-86

HENLE 1841 y 1865 citado por Böck 1982

HISA Y., 1982 a. Fluorescence Histochemical studies on the noradrenergic innervation of the canine larynx. Acta anat. 113: 15-25

HISA Y., MATSUI T., FUKUI K., IBATA Y., MIZUKOSHI O., 1982 b. Ultrastructural and fluorescence hisochemical studies on the sympathetic innervation of the canine laryngeal glands. Acta Otolaryngol 93: 119-122

HISA Y., SATO F., FUKUI K., IBATA Y., MIZUKOSHI O., 1985. Substance P nerve fibers in the canine larynx by PAP immunohistochemistry. Acta Otolaryngol (Stockh) 100:128-33.

HISA Y., UNO T., TADAKI N., MURAKAMI Y., OKAMURA H., IBATA Y., 1992. Distribution of calcitonin gene-related peptide nerve fibers in the canine larynx Eur Arch Otorhinolaryngol 249: 52-55

HISA Y., TADAKI N., UNO T., OKAMURA H., TAGUCHI J-I., IBATA Y. 1994 Neuropeptide participation in canine laryngeal sensory innervation. Immunohistochemistry and retrograde labeling. *Ann. Otol Rhinol Laryngol.* 103: 767-70.

HISA Y., KOIKE S., UNO T., TADAKI N., TANAKA M., OKAMURA H., IBATA Y., 1996 a Nitroergic neurons in the canine intrinsic laryngeal muscle. *Neuroscience Letters* 203: 45-48

HISA Y., TADAKI N., UNO T., KOIKE S., TANAKA M., OKAMURA H., IBATA Y., 1996 b Nitroergic innervation of the rat larynx measured by nitric oxide synthase immunohistochemistry and NADPH-Diaphorase histochemistry. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 105: 550-554

HISA Y., UNO T., TADAKI N., KOIKE S., BANBA H., TANAKA M., OKAMURA H., IBATA Y., 1996 c Relationship of neuropeptides to nitroergic innervation of the canine laryngeal glands. *Regulatory peptides* 66: 197-201

HISA Y., KOIKE S., TADAKI N., BANBA H., SHOGAKI K., UNO T., 1999 Neurotransmitters and neuromodulators involved in laryngeal innervation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 108: 3-14

HOHBACH C., MOOTZ W., 1978 Chemodectoma of the larynx a clinico-Pathological study. *Virchows Arch A Path. Anat and histol* 378: 161-172.

HÖKFELT T., FUXE K., PERNOW B., (eds) 1986 Coexistence of neuronal messengers: a new principle in chemical transmission. *Progress in Brain research*, vol 68. Ed. Elsevier.

HONMA K., 1994 Paraganglia of the urinary bladder. An autopsy study. *Zentralbl. Pathol.* 139 (6): 465-9

HOPE BT., MICHAEL G.J., KNIGGE K.M., VINCENT S.R., 1991 Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2811-4.

HUGHES J., SMITH T.W., KOSTERLITZ H.W., FOTHERGILL L.A., MORGAN B.A., MORRIS H.R., 1975 Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258: 577-579

HSU S.M., RAINE L., FANGER H., 1981 Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem Cytochem* 29: 577-580

JANSEN H.H., & NETTY-MARBELL A.O., 1967 Die parasymphatischen Paraganglien des menschlichen Kehlkopfes. *Zbl. Allg. Path.* 110: 246-250.

JUSTRABO E., MICHIELS R., CALMETTES C., CABANNE F., BASTEIN H., HORIOT J.C., GUERRIN J., 1980 An uncommon apudoma: a functional chemodectoma of the larynx. *Acta otolaryngol* 89: 135-143

KARLSSON J-A., PERSSON C.G.A., 1991 Novel peripheral neurotransmitters and control of the airways. En Bell C. (editor) *Novel peripheral neurotransmitters*. New York: Pergamon Press pp 193-220

KAWABATA K., 1999 Paraganglia of the gallbladder: A report of two cases with an Immunohistochemical study. *Pathol. Res. Pract.* 195: 781-786.

KAWASOE M., SHIN T., MASUKO S., 1990 Distribution of neuropeptide-like immunoreactive nerve fibers in the canine larynx. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 103: 957-62.

KHON 1903 citado por Böck 1982.

KJAERGAARD J., 1973 Anatomy of the Carotid Glomus and Carotid Glomus-like Bodies (Non-chromaffin Paraganglia) Copenhagen. Arhus. Odense. F.A.D.L's Forlag.

KLEINSASSER O., 1964 Das glomus laryngicum inferior. Ein bisher unbekanntes, nicht chromaffines Paraganglion vom Bau der sog. Carotisdrüse im menschlichen Kehlkopf. Arch Ohren Nasen u Kehlk-Heilk 184:214-224

KLEINSASSER O., 1966 Nichtchromaffine Paraganglien vom Bau der sogenannten Carotisdrüse im menschlichen Kehlkopf. Köln Mschr Ohrenheilk 100: 283-295.

KORKALA O., WARIS T., 1977 Acetylcholinesterase reaction and catecholamine fluorescence in glomus cells of rat carotid body. Experientia (Basel) 33:1363-1364.

KUMMER W., FISCHER A., MUNDEL P., MAYER B., HOBA B., PHILIPPIN B., PREISLER U., 1992 Nitric oxide synthase in VIP-containing vasodilator nerve fibers in the Guinea-pig. Neuro Report 3:653-655.

LACHARD A., HASSOUN J., CHARPIN C., TOGA M., 1984 Les paragangliomes de la tête et du cou (chémodectomes) aspects anatomopathologiques. Actualites de carcinologi cervico-faciale n°10: 1-17.

LAWSON W., & ZAK F.G., 1974 The glomu bodies ("Paraganglia") of the human larynx. Laryngoscope 84:98-111

LEE B.H., LYNN R.B., LEE H-S., MISELIS R.R., ALTSCHULER S.M., 1992 Calcitonin gene-related peptide in Nucleus Ambiguus Motoneurons in rat: Viscerotopic organization. The journal of comparative neurology 320:531-543

LEMERE F., 1932 Innervation of the larynx II. Ramus anastomoticus and ganglion cells of the superior laryngeal nerve. American journal of anatomy 54 (3): 389-437

LIDEGRAN M., DOMEIJ S., DAHLQVIST A., HENRIKSSON R., FRANZEN L., GUSTAFSSON H., FORSGREN S., 1995 Irradiation influences the expression of substance P and enkephalin in the rat larynx. Cell tissue Res 279: 55-63

LU K.S., CHIEN Ch-L., CHAU Y-P., 1992 Effects of 5-hydroxydopamine and 6-hydroxydopamine on the ultrastructure of type I cells in paraganglia of the rat recurrent laryngeal nerve. Arch. Histol. Cytol. 55: 57-65

LÜ Y., DING Y-Q., QIN B-Z., LI J-S., 1994 The distribution and origin of axon terminals with NADPH diaphorase activity in the nucleus of the solitary tract of the rat. Neuroscience Letters 171:70-72

LUNDBERG J.M., TERENIUS L., HÖKFELT T., MARTLING C.R., TATEMOTO K., MUTT V., POLAK J., BLOOM S., GOLDSTEIN M., 1982. Neuropeptide Y (NP-Y)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NP-Y on sympathetic function. Acta Physiol Scand 116: 477- 480.

LUNDBERG J.M., TERENIUS L., HÖKFELT T., GOLDSTEIN M., 1983 High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man. Neurosci Lett. 42: 167-172

LUNDBERG J.M., HÖKFELT T., MARTLING C.R., SARIA A., CUELLO C., 1984 Substance P immunoreactive sensory nerves in the lower respiratory tract of various mammals including man. Cell Tissue Res 235: 251-261.

LUTS A., UDDMAN R., GRUNDITZ T., SUNDLER F., 1990 Peptide-containing neurons projecting to the vocal cords of the rat: retrograde tracing and immunocytochemistry. Journal of the autonomic nervous system 30:179-192

LUTS A., UDDMAN R., ALM P., BASTERRA J., SUNDLER F., 1993 Peptide-Containing nerve fibers in human airways: Distribution and coexistence pattern. *Int Arch Allergy Immunol* 101:52-60.

MARTINEZ-MADRIGAL F., BOSQ J., MICHEAU Ch., NIVET P., LUBOINSKI B., 1991 Paragangliomas of the Head and Neck. Immunohistochemical analysis of 16 cases in comparison with neuro-endocrine carcinomas. *Path. Res. Pract.* 187: 814-823.

MARTINSON F.D., FROSE Ch.B., 1967 Chemodectoma of the glomus laryngicum inferior. *Arch Otolaryng* 86: 70-73

MASSON 1924 citado por Lachard 1984

MASUKO S., KAWASOE M., CHIBA T., SHIN T., 1991 Target-specific projections of intrinsic ganglionic neurons with different chemical codes in the canine larynx *Neuroscience Research* 9:270-278

MATTHEWS MR., RAISMAN G., 1969 The ultrastructure and somatic efferent synapses of small granule-containing cells in the superior cervical ganglion. *J Anat (Lond)* 105: 255-282

McDONALD D.M., MITCHELL R A., 1975 The innervation of glomus cells, ganglions cells and blood vessels in the rat carotid body: a quantitative ultrastructural analysis. *Journal of neurocytology* 4: 177-230

McDONALD D.M., BLEWETT R.W., 1981 Location and size of carotid-body organs (paraganglia) revealed in rats by permeability of blood vessels to Evans Blue dye. *Journal of neurocytology* 10: 607-643

McQUAID S., McCONNELL R., McMAHON J., HERRON B., 1995 Microwave antigen retrieval for immunocytochemistry on formalin-fixed, paraffin-embedded post-mortem CNS tissue. *Journal of pathology* 176: 207-216.

- MULLIGAN R.M., 1950 Chemodectoma in the dog. Am. J. Pathol. 26: 608-681.
- MYSSIOREK D., 2001 Paragangliomas de cabeza y cuello. McGraw-Hill Interamericana editores. Clinicas Otorrinolaringologicas de Norteamerica. Vol 5: 817-824.
- NAKANISHI Y., TOOYAMA I., YASUHARA O., AIMI Y., KITAJIMA K., KIMURA H., 1999 Immunohistochemical localization of choline acetyltransferase of a peripheral type in the rat larynx. Journal of Chemical Neuroanatomy 17: 21-32
- NEUHUBER W.L., WÖRL J., BERTHOUD H-R., CONTE B., 1994 NADPH-diaphorase-positive nerve fibers associated with motor endplates in the rat esophagus: new evidence for co-innervation of striated muscle by enteric neurons. Cell Tissue Res 276: 23-30.
- NICOLAS A., 1894 citado por Grynfeldt & Hedón 1907
- O'CONNOR D.T., BURTON D., DEFTOS L.J., 1983. Chromogranin A: Immunohistology reveals its universal occurrence in normal polypeptide hormone producing endocrine glands. Life sciences. Vol 33:1657-1663
- PEARSE AGE., 1966 Common cytochemical properties of cells producing polypeptide hormones with particular reference to calcitonin and the thyroid C cells. Vet. Rec. 79: 587-590.
- PEARSE AGE., 1969 The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone producing cells of the APUD series and embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. J Histochem Cytochem 17: 303-313
- PEARSE AGE., 1984 The diffuse neuroendocrine system: Historical review. Front Horm Res 12: 1-7.
- PERRIN C., FLOQUET J., ANDRE J.M., PLENAT J.F., PETIT C., 1978 Reflexions a propos d'un chemodectome larynge. Oto-neuro-opht 50: 173-179

- PETERSON K.L., FU Y-S., CALCATERRA T., 1997 Subglottic paraganglioma. *Head and Neck* 19: 54-56
- PESCE C., TOBIA-GALLELLI F., TONCINI C., 1984 APUD Cells of the Larynx. *Acta otolaryngol (Stockh)* 98: 158-162
- PIQUET J.J., DUPONT A., HOUCHE M., 1976 Les paragangliomes non chromaffines du larynx. *Ann. Oto-Laryng* 93: 255-262
- PILERI S., RONCADOR G., CECCARELLI C., PICCIOLI M., BRISKOMATIS A., SABATTINI E., AND CO-WOKERS 1997 Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: Comparison of different methods. *Journal of pathology* 183: 116-123.
- POLAK J.M., & BLOOMS S.R., 1980 Peripheral localization of regulatory peptides as a clue to their function. *The journal of histochemistry and cytochemistry* 28 (8): 918-924.
- PUCHTLER H. & MELOAN S.N. 1985 On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry* 82: 201-204.
- RAMASWAMY S., 1963 A ganglion on the internal laryngeal nerve a preliminary report *J. Anat. Soc. Ind.* 12: 1-7
- RAMASWAMY S., KULASEKARAN D., 1974 The ganglion on the internal Laryngeal nerve. *Arch Otolaryngol* 100:28-31
- RAMASWAMY S., SHANKAR S.K., MANJUNATH K.Y., DEVANATHAN P.H., NITYASEELAN N., 1994 Ultrastructure of the ganglion on human internal laryngeal nerve. *Neuroscience Research* 18: 283-290
- REMAK R. 1840 Citado por Grynfelt & Hedón 1907

RUBALTELLI E., 1934 Contributio istologico alla conoscenza del componente simpatico dell'innervazione della laringe. Att Soc Med Chir Padova 11: 496-507

SAID S.I., MUTT V., 1970 Polypeptide with broad activity: isolation from small intestine. Science 169: 1217-1218.

SALIM S.A., MILROY C., RODE J., CORRIN B., HAMID Q., 1993 Immunocytochemical characterization of neuroendocrine tumours of the larynx. Histopathology 23: 69-73

SAÑUDO J.R., DOMÉNECH-MATEU J.M., 1990 Laryngeal ganglia associated with recurrent nerves. Proceedings of the XIV World Congress of Otorhinolaryngology, Head & Surgery Madrid Spain. Sacristan T. Alvarez-Vicent J. Bartual J. Antolí-Candela F. Editores. Amsterdam Berkeley Milano: Kugler & Ghedini

SCHÖMBERGER von W., 1969 Die Entwicklung des Paraganglion on the internal laryngeuen beim Menschen. Anat. Anz. Bd 125:512-524

SERRANO FIGUERAS S., CORDON CARO C., Y COROMINAS TORRES J.M. 1985 Inmunohistoquímica (I) Med. Clin. 84: 366-372

SHI S-R., KEY M.E., KALRA K.L., 1991 Antigen Retrieval in Formalin-fixed, Parffin-embedded Tissues: An Enhancement Method for Immunohistochemical Staining Based on Microwave Oven Heating of tissue Sections. The journal of Histochemistry and cytochemistry. 39 (6):741-748

SHIMAZAKI T., YOSHIDA Y., HIRANO M., 1995 Arrangement and number of intralaryngeal ganglia and ganglionic neurons: comparative study of five species of mammals. The journal of Laryngology and Otology 109: 622-629.

SHIN T., WATANABE S., WADA S., MAEYAMA T., 1987 a. Sensory nerve endings in the mucosa of the epiglottis. Morphologic investigations with silver

impregnation, immunohistochemistry, and electron microscopy. *Otolaryngol Head and Neck surg.* 96:55-62.

SHIN T., WADA S., MAEYAMA T., WATANABE S., 1987 b. Substance P immunoreactive nerve fibers of the canine laryngeal mucosa. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 97:39-46.

SNEIGE N., MACKAY B., ORDONEZ N.G., BATSAKIS J.G., 1983 Laryngeal paraganglioma. Reports of two Tumors with Immonohistochemical and ultrastructural Analysis. *Arch. Otolaryngol* 109: 113-117

SNYDER SH., 1992 Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitter? *Science* 257: 1862-5

SOLWAY J., LEFF A.R., 1991 Sensory neuropeptides and airway function. *J. Appl. Physiol.* 71: 2077-2087

SOULIE J., BARDIER A., 1907 Recherche sur le développement du larynx chez l'home. *Jour de l'Anat.et de Phys* 43:137-240

STEPHENS R.E., WENDEL K.H., ADDINGTON W.R., 1999 Anatomy of the internal Branch of the superior layryngeal nerve. *Clinical anatomy* 12: 79-83

STERNBERGER LA., HARDY PH Jr, CUCULIS JJ., MEYER HG., 1970 The unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-anti-horseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem Cytochem* 18: 315-333

SUGANO M., 1929 Über die Kehlkopfnerven. Experimentelle Untersuchungen über die Innervation des Kehlkopfes. *J. Otolaryngol Jpn* 35: 1338-1361

TANAKA Y., YOSHIDA Y., HIRANO M. MORIMOTO M., KANASEKI T., 1993 a
Distribution of SP and CGRP- immunoreactivity in the cat's larynx. The journal
of Laryngology and Otology 107:522-526.

TANAKA Y., YOSHIDA Y., HIRANO M. 1993 b. Ganglionic neurons in vagal
and laryngeal nerves projecting to larynx and their peptidergic features in the
cat. Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl. 506:61-66.

TANAKA Y., YOSHIDA Y., HIRANO M., 1993 c. CGRP-immunoreactive cells
supplying laryngeal sensory nerve fibers in the cat's nodose ganglion. The
Journal of Laryngology and Otology 107: 916-919.

TANAKA Y., YOSHIDA Y., HIRANO M., 1995 Precise localization of VIP, NP-Y
and TH-Immunoreactivities of cat laryngeal glands. Brain Research Bulletin 36
(3): 219-224

TATEMOTO K. CARLQVIST M. MUTT V. 1982 Neuropeptide Y a novel brain
peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide.
Nature 296: 659-660.

TISCHER A.S., 1997 Paraganglia En: Stenberg S.S. editor. Histology for
Pathologists. Philadelphia: Lippincott-Raven pp:1153-1172

TOOYAMA I., KIMURA H., 2000 A protein encoded by an alternative splice
variant of choline acetyltransferase mRNA is localized preferentially in
peripheral nerve cells and fibers. J. Chem. Neuroanat. 17: 217-226

TSUDA K., SHIN T., MASUKO S., 1992 Immunohistochemical study of
intralaryngeal ganglia in the cat. Otolaryngol Head Neck Surg. 106:42-46.

UDDMAN R., ALUMETS J., DENSERT O., HAKANSON R., SUNDLER F., 1978
Occurrence and distribution of VIP nerves in the nasal mucosa and
tracheobronchial wall. Acta Otolaryngol 86: 443-448

UNO T., HISA Y., MURAKAMI Y., OKAMURA H., IBATA Y., 1992 Distribution of tyrosine hidroxilase immunoreactive nerve fibers in the canine larynx. Eur Arch Otorhinolaryngol 249: 40-43.

UNO T., HISA Y., TADAKI N., OKAMURA H., IBATA Y., 1996 Tyrosine hydroxylase-immunoreactive cells in the nodose ganglion for the canine larynx. Neuro Report 7: 1373-1376.

VON EULER U.S., & GADDUM J.H., 1931 An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. J. Physiol., Lond 72: 74-87.

VAN DE KANT HJG., BOON ME., DE ROOIJ DG., 1988 Microwave-aided technique to detect bromodeoxyuridine in S-phase cells using immunogold-silver staining and plastic-embedded sections. Histochem. J. 20: 335-340

WASSERMAN P.G., y SAVARGAONKAR P., 2001. Paragangliomas, Clasificación , histopatología y diagnóstico diferencial. En McGraw-Hill Interamericana, editores. Clinicas otorrinolaringológicas de Norteamérica. Paragangliomas de Cabeza y cuello. Volumen 5. México D.F. Pag. 833-849

WATZA M. 1943 citado por Böck 1982

WATZA M. 1963 Über paraganglien in der Plica ventricularis des menschlichen Kehlkopfes Med Forsch 1:19-20

WERNER 1857 citado por Tischler 1997

WETMORE R.F., TRONZO R.D., LANE R.J., LOWRY L.D., 1981 Nonfunctional Paraganglioma of the larynx: Clinical and pathological considerations. Cancer 48 (12): 2717-2723

WICK M.R., 2000 Neuroendocrine neoplasia: Current concepts. Am J Clin Pathol 113: 331-335

WIDDICOMBE 1973 citado por Wyke y Kirchner 1976

WINKLER H., APPS D.K., FISCHER-COLBRIE R., 1986 The molecular function of adrenal chromaffin granules: established facts and unresolved topics. *Neuroscience* Vol. 18 (2): 261-290

WOODDS A.E., & ELLIS R..C., 1994 *Laboratory Histopatology. A complete reference.* Churchill Livingstone

WU W., LI L., 1993 Inhibition of nitric oxide synthase reduces motoneuron death due to spinal root avulsion. *Neuroscience Letters* 153: 121-124

WU W., HAN K., LI L., SCHINCO F. P., 1994 Implantation of PNS graft inhibits the induction of neuronal nitric oxide synthase and enhances the survival of spinal motoneurons following root avulsion. *Experimental neurology* 129:335-339

WYKE BD., & KIRCHNER JA., 1976 *Neurology of the larynx.* En *Scientific Foundations of Otolaryngology.* Hinchciffe R. & Harrison D. (Editors) Ed. Willians Heineanan Medica Books London 546-574

YOSHIDA Y., TANAKA Y., SAITO T., SHIMAZAKI T., HIRANO M., 1992 *Peripheral Nervous System in the Larynx. An Anatomical Study of the motor, sensory and Autonomic Nerve Fibers.* *Folia Phoniatr.* 44:194-219

YOSHIDA Y., SHIMAZAKI T., TANAKA Y., HIRANO M., 1993 *Ganglions and Ganglionic Neurons in the Cat's Larynx.* *Acta Otolaryngol (Stockh)*113: 415-420

YOSHIDA Y., TANAKA Y., HIRANO M., NAKASHIMA T., 2000 *Sensory Innervation of the Pharynx and Larynx.* *The American Journal of Medicine* 108 Suppl (4 A) 51-61

ZAK F.G., LAWSON W., 1972 *Glomic (Paraganglionic) Tissue in the larynx and capsule of the thyroid gland.* *Sinai Journal Med* 39: 82-90

ZAK FG LAWSON W. editores 1983 The paraganglionic chemoreceptor system: Physiology, pathology and clinical medicine. New York: Springer-Verlag.

ZEITLHOFER J. 1955. Ungewöhnlicher tumor im Larynx (chromophobes paragangliom). Mschr. Ohrenheilk. 89: 133-136

ZUCKERKANDL E. 1901 citado por Tischler 1997