

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía II



TESIS DOCTORAL

Somatotopía de los músculos laríngeos en el núcleo ambiguo de la rata

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carlos Ramírez Calvo

Directores

F.J. Valderrama Canales

A. Pascual Font

B. Scola Yurrita

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA II



*Somatotopía de los
músculos laríngeos en el
núcleo ambiguo de la rata*

TESIS DOCTORAL

Carlos Ramírez Calvo
Septiembre de 2011

Directores

Dr. F.J. Valderrama Canales

Dra. A. Pascual Font

Dr. B. Scola Yurrita



El Dr. Francisco J. Valderrama Canales, profesor titular de Anatomía y Embriología Humanas de la Universidad Complutense de Madrid, la Dra. Arán Pascual Font y el Dr. Bartolomé Scola Yurrita, profesor asociado de ORL de la Universidad Complutense de Madrid

HACEN CONSTAR:

Que la memoria para optar al grado de doctor que presenta a superior juicio del Tribunal D. CARLOS RAMÍREZ CALVO, con el título " SOMATOTOPIA DE LOS MÚSCULOS LARINGEOS EN EL NÚCLEO AMBIGUO DE LA RATA", ha sido realizada bajo nuestra dirección.

Consideramos que su autor está capacitado para obtener el grado de doctor, siempre y cuando así lo considere el Tribunal designado por la Universidad Complutense de Madrid para juzgar la memoria.

Firmado en Madrid a 14 de septiembre de 2011.

Los directores de la tesis

Francisco J. Valderrama Canales

Arán Pascual Font

Bartolomé Scola Yurrita

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

La realización de una tesis es un trabajo arduo y prolongado, que exige la colaboración de compañeros, amigos y familia para aportar no sólo los conocimientos, sino también la fuerza y energía necesarias para llevarla a buen fin. Este ha sido el caso y por eso me gustaría escribir unas líneas de agradecimiento.

Al Catedrático Dr. D. Jose Ramón Sañudo, cuya entrega e ilusión es una constante motivación y estímulo para investigar y a toda la cátedra de Anatomía I de la Universidad Complutense de Madrid, Dra. Dña. Teresa Vazquez, Dra. Dña. Eva Marañillo y especialmente al próximo Doctor, D. Ignacio Hernández Morato sin cuyos consejos y ayuda el trabajo habría supuesto un esfuerzo inabarcable.

A todos mis compañeros ORL, tanto aquellos con los que he tenido más trato como mis compañeros del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, donde me formé y a los del Hospital del Henares donde ahora trabajo, como aquellos con los que he tenido menos trato pero de los que he aprendido en charlas, congresos y cursos de formación.

A los codirectores de la Tesis Dr. D. Francisco Valderrama Canales y Dra. Dña. Aran Pascual Font, que no sólo han aportado sus conocimientos, sino que han sabido dirigir y orientar la Tesis en todo momento de manera que las dificultades se transformasen en oportunidades y que en los momentos de duda hubiese fuerzas para continuar.

Al codirector de la Tesis, Prof. Dr. D. Bartolomé Scola Yurrita, que desde el principio de mi formación como ORL ha sido, y sigue siendo, un referente para mí como profesional y como persona. No sólo ha dirigido mis pasos en esta Tesis, sino que ha sabido ir guiando mis pasos en la ORL y ha sabido ser mi mentor, profesor, compañero y sobre todo amigo.

A mi familia, mis padres, Dionisio y Pilar, que han sabido inculcarme los valores realmente importantes en la vida, y que son ejemplo constante tanto en los buenos momentos, como en aquellos en los que hay que hacer frente a los que no son tan buenos; a mis hermanas, Mónica, Gloria y Piluca, y a sobrinos y cuñados, a los que siempre puedo acudir y que siempre me ofrecen su cariño desinteresado.

A mis amigos que cada día me muestran el verdadero valor de la palabra amistad, gracias por vuestra lealtad y confianza.

A Juan y Alicia, que cada día me aportáis felicidad, ilusión, cariño y un montón de sonrisas.

A Paz, que das sentido a todo, y eres la razón de todo.

ÍNDICE

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LA LARINGE.....	3
1.1.1. ANATOMÍA DE LA LARINGE	5
1.1.1.1. ESQUELETO CARTILAGINOSO DE LA LARINGE.....	5
1.1.1.2. MEMBRANAS Y LIGAMENTOS.....	7
1.1.1.3. MUSCULATURA LARÍNGEA.....	8
1.1.1.4. VASCULARIZACION LARÍNGEA	12
1.1.1.5. INERVACION LARINGEA. NERVIOS LARINGEOS	14
1.1.2. ASPECTOS EMBRIOLÓGICOS DEL DESARROLLO DE LA LARINGE	20
1.1.3. FILOGENIA DE LA LARINGE.....	26
1.1.4. CENTROS NERVIOSOS DEL CONTROL LARINGEO	32
1.1.4.1. EL NUCLEO AMBIGUO: ORGANIZACIÓN GENERAL Y DE LAS NEURONAS DE LA MUSCULATURA INTRÍNSECA LARÍNGEA	32
1.1.4.2. LOS NUCLEOS DORSAL DEL VAGO Y DEL TRACTO SOLITARIO	51
1.1.5. FISIOLÓGIA	54
1.1.5.1. FUNCIONES DE LA LARINGE	54
1.1.5.1.1. ESFINTERIANA.....	55
1.1.5.1.2. RESPIRATORIA	59
1.1.5.1.3. FONATORIA	62
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	65
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	71
3.1. MODELO ANIMAL.....	73
3.1.1. ANATOMÍA DE LA LARINGE DE LA RATA	75
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	78
3.2.1. TRAZADOR NEURONAL: LA SUBUNIDAD β DE LA TOXINA COLÉRICA.....	79
3.2.2. TÉCNICA QUIRÚRGICA E INYECCIÓN DEL TRAZADOR	82
3.2.3. PROCESAMIENTO DEL TRONCO DEL ENCÉFALO	86

3.2.4. IDENTIFICACIÓN, CUANTIFICACIÓN, UBICACIÓN Y MORFOMETRÍA DE LAS NEURONAS TRAZADAS.....	89
4. RESULTADOS.....	91
4.1. INYECCIONES EN EL MÚSCULO CRICOTIROIDEO	93
4.2. INYECCIONES EN EL MÚSCULO CRICOARITENOIDEO POSTERIOR	97
4.3. INYECCIONES EN EL MÚSCULO TIROARITENOIDEO.....	101
4.4. INYECCIONES IPSILATERALES DE DOS MÚSCULOS	106
5. DISCUSION.....	111
5.1. MÚSCULO CRICOTIROIDEO.....	113
5.2. MÚSCULO CRICOARITENOIDEO POSTERIOR	119
5.3. MÚSCULO TIROARITENOIDEO	127
5.4. SOLAPAMIENTO DE LOS TERRITORIOS DE LAS POBLACIONES NEURONALES.....	131
6. CONCLUSIONES.....	137
7. BIBLIOGRAFIA	141

1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- LA LARINGE

La laringe es un órgano tubular, tapizado internamente por un epitelio mucoso, localizado en la región anterior y media del cuello, craneocaudalmente entre la faringe y la tráquea y, en el hombre adulto, aproximadamente entre la 3ª y la 6ª vértebras cervicales. Está constituida por un conjunto de cartílagos articulados y unidos entre sí por un complejo de ligamentos y membranas. Un grupo de músculos, que constituyen la denominada musculatura laríngea intrínseca, es el encargado de ejecutar los movimientos que permiten a la laringe el cierre y la apertura de la vía aérea (McHanwell, 2008).

La función esencial y vital de la laringe es permitir que el flujo de aire discurra hacia las vías respiratorias bajas para que alcance los pulmones. La segunda función, también esencial para la vida, es la de constituir un órgano protector del tracto respiratorio, de tal manera que funciona como un esfínter que permite el paso de aire pero impide, al cerrarse por la acción de los músculos intrínsecos laríngeos, que sustancias extrañas penetren en el tracto respiratorio. Este mecanismo preciso de control de la apertura y cierre de la vía respiratoria permite toda una serie de acciones accesorias pero con relevancia funcional. Así, el estímulo que representa la presencia de partículas extrañas en la mucosa desencadena el reflejo tusígeno que, gracias a la súbita y violenta expulsión de aire, permite expulsar dichas sustancias del tracto respiratorio (Zemlin, 1998). Por otro lado, el cierre de la vía aérea cuando los pulmones están llenos de aire provoca una estabilización de la cintura escapular y de la caja torácica (Fink y Demarest, 1978) que favorece actividades como levantar o desplazar pesos con de los miembros superiores, o que requieren grandes presiones intraabdominales como la defecación, la micción o incluso el parto (Zemlin, 1998). Por último, la laringe es el órgano de la fonación. La producción de la voz es una función

adquirida secundariamente a la esfinteriana aunque es de extraordinaria relevancia ya que el habla, como forma articulada de la voz, es la principal forma de comunicación de los seres humanos. Debido a la extraordinaria capacidad de comunicación de la voz, no resulta extraño que un trastorno que conduzca irreversiblemente a la pérdida de la función fonatoria de la laringe traiga consigo un deterioro psicológico al afectado (Zemlin, 1998).

1.1.1.- ANATOMÍA DE LA LARINGE

1.1.1.1.- ESQUELETO CARTILAGINOSO DE LA LARINGE

El esqueleto de la laringe, está conformado por una serie de cinco cartílagos principales (cartílago tiroides, cartílago cricoides, cartílago epiglótico y los dos cartílagos aritenoides) y cuatro accesorios (los dos cartílagos accesorios y los dos corniculados) que se unen entre sí y con las estructuras extralaríngeas mediante una serie de membranas y ligamentos.

El cartílago tiroides es un cartílago hialino que está constituido por dos láminas formando un ángulo diedro de unos 90° en el hombre, y unos 120° en la mujer (Bourdial y cols., 1954; Portmann, 1960). En su parte posterior, cada lámina presenta sendas prolongaciones o astas, dos superiores y dos inferiores. Las dos superiores para unirse mediante un ligamento al hueso hioides y las inferiores se articulan con el cartílago cricoides, constituyendo así las únicas articulaciones directas del cartílago tiroideo, pues todas las demás relaciones con estructuras vecinas se mantienen gracias a ligamentos y músculos (Yanagisawa y Hausfeld, 1987).

El cartílago cricoides, situado debajo del tiroides y sobre el primer anillo traqueal, tiene forma de anillo de sello y se sitúa en el plano transversal C6-C7 en el adulto y C3-C4 en el niño. Su borde superior se une con el borde inferior del tiroides mediante la membrana cricotiroidea. El borde inferior se encuentra unido al primer anillo traqueal mediante la membrana cricotraqueal. En el borde superior de la lámina se sitúan dos carillas articulares para los cartílagos aritenoides que permiten movimientos de balanceo y deslizamiento, lo que se traduce en la abducción y aducción de los pliegues vocales. Gracias a las características de estas carillas articulares, se puede llegar a realizar traslaciones y movimientos de giro de las apófisis vocales, añadiendo complejidad a la dinámica articular (Perrin y Perrin, 1985). En los

laterales, el cricoides presenta una superficie articular a cada lado para las astas inferiores del tiroides. Estas articulaciones sinoviales cricotiroideas permiten el movimiento de basculación posterior del cricoides respecto al tiroides, que permite por acción del músculo cricotiroideo aumentar la tensión y longitud de los pliegues vocales (Tucker, 1993).

Los cartílagos aritenoides son dos cartílagos con forma de pirámide triangular de vértice superior. La base del cartílago se articula con la carilla articular del cricoides. El ángulo anterior de la base se prolonga horizontalmente para formar la apófisis vocal, sobre la que se inserta la parte posterior del pliegue vocal. El ángulo externo de la base forma la apófisis muscular, sobre la que se insertan los músculos cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides (Hanafe, 1990).

El cartílago epiglótico es una estructura de naturaleza fibrocartilaginosa que no se osifica (Bourdial y cols., 1954; Fried, 1988). Se ancla a la cara anterior e interna del cartílago tiroides por el ligamento tiroepiglótico. Su extremo superior se une, por su cara anterior, con el dorso de la lengua a través de los ligamentos glosopiglóticos, y con el cuerpo del hioides mediante el ligamento hioepiglótico. Lateralmente, se une a los aritenoides por los ligamentos aritenoepiglóticos, y a la faringe por los ligamentos faringoepiglóticos.

Los cartílagos accesorios son dos pares de cartílagos fibroelásticos situados dentro del repliegue ariepiglótico. Los situados por encima de los aritenoides son denominados cuneiformes (de Wrisberg) y el par más superior, son los cartílagos corniculados (de Santorini). Tienen poca importancia fisiológica, aparte de prestar alguna consistencia al pliegue ariepiglótico (Meller, 1984).

1.1.1.2.- MEMBRANAS Y LIGAMENTOS

Las estructuras laríngeas cartilaginosas se mantienen formando un armazón, gracias a un sistema de membranas y ligamentos que además de sujetarlas entre sí, permiten una gran elasticidad de movimientos (Yanagisawa y Hausfeld., 1987):

- Membrana tirohioidea, es una amplia banda elástica que se extiende por el borde superior del cartílago tiroides y asciende hasta el inferior del hueso hioides. Esta membrana es atravesada por el paquete compuesto por arteria, vena y nervio laríngeo superior.
- Membrana cricotiroidea. Sujeta el borde inferior del tiroides y el margen superior del cricoides.
- Membrana cricovocal o cono elástico, que se origina en la superficie interna del arco cricoideo, extendiéndose medial y superiormente hasta insertarse en el ligamento vocal, el cual está en realidad constituido por las condensaciones de esta membrana cricovocal.
- Ligamento vocal. Conformar la estructura fibrosa que subyace bajo la mucosa del borde libre del pliegue vocal (Hirano y cols., 1989).
- Membrana cuadrangular. Se origina en la cara interna de la epiglotis y en el repliegue ariepiglótico, extendiéndose posteriormente hasta los cartílagos aritenoides y corniculados. En su porción inferior se une al ligamento vestibular, en la banda ventricular y se extiende hacia caudal alrededor del ventrículo hasta el borde superior del repliegue vocal.

1.1.1.3.- MUSCULATURA LARÍNGEA

MUSCULATURA LARÍNGEA EXTRÍNSECA

La musculatura extrínseca es capaz de fijar el complejo laringotraqueal a lo largo del eje vertical (Lacau St. Guily y Fardeau, 1983) y está formada por los siguientes músculos:

- Músculos suprahioideos: digástrico, estilohioideo, genihioideo, y milohioideo . También colabora el músculo estilofaríngeo, del grupo elevador de la faringe. El músculo milohioideo es innervado por ramas del nervio maxilar inferior, los músculos digástrico y estilohioideo por ramas del facial y el músculo genihioideo por ramas del hipogloso. Todos son elevadores de la laringe: la elevan durante la espiración, la deglución y algunos modos de fonación. Los mayores movimientos en bloque se producen durante la deglución. Los músculos suprahioideos desplazan la laringe hacia arriba y adelante, lo que, asociado al descenso de la base lingual, comprime la epiglotis contra el vestíbulo laríngeo, protegiendo así a la vía aérea de posibles aspiraciones.
- Músculos infrahioideos: omohioideo, esternotiroideo, tirohioideo y esternohioideo. Descienden la laringe durante la inspiración y están innervados por el asa cervical. La acción coordinada y antagonista de los dos grupos de músculos hioideos es capaz de estabilizar el bloque laringo-traqueal en cualquier punto, desde su situación más descendida hasta la más elevada (Tucker, 1993).
- Músculos constrictores faríngeos: constrictor medio y constrictor inferior. Al igual que los infrahioideos, contribuyen a la sujeción laríngea y a sincronizar sus movimientos con los del hioides, pero juegan su papel fundamental durante la deglución, pues prácticamente no tienen efecto sobre

las funciones intrínsecas laríngeas. Están inervados por el nervio glossofaríngeo y vago respectivamente.

MUSCULATURA LARÍNGEA INTRÍNSECA

Los músculos intrínsecos presentan sus dos inserciones en la laringe y son los responsables de los movimientos de los cartílagos laríngeos. Todos estos músculos, menos el cricotiroideo, están inervados por ramas del nervio recurrente. Los músculos son:

- **Músculo cricoaritenoso posterior.** Se extiende desde la parte posterior de la lámina del cricoides hasta la superficie posterior de la apófisis muscular del aritenoides. Es el único músculo abductor de los pliegues vocales, sirve para abrir la glotis al imprimir un movimiento de rotación de los aritenoides.
- **Músculo cricoaritenoso lateral.** Se extiende desde el borde superior del arco cricoideo hasta el borde anterior de la apófisis muscular del aritenoides. Su función es cerrar la glotis mediante un movimiento de rotación interna de los aritenoides, que aproxima ambas apófisis vocales.
- **Músculo aritenoso, porción transversa.** Es el único músculo impar. Sus fibras se extienden entre las apófisis musculares de los aritenoides. Su contracción hace que se cierre la comisura posterior. Al actuar junto con el cricoaritenoso lateral produce un cierre completo de la glotis, de enorme importancia durante la deglución.
- **Músculos aritenoso, porción oblicua, y ariepiglótico.** Sus fibras se cruzan diagonalmente, estableciendo digitaciones con la porción transversa del aritenoso. En la parte superior se continúa por el repliegue ariepiglótico,

formando el músculo del mismo nombre. La acción de estos músculos es producir un cierre esfinteriano del vestíbulo laríngeo durante la deglución.

- Músculo tiroaritenoides. Es una banda muscular ancha, que se extiende desde la superficie interna del cartílago tiroides y parte del cono elástico, hasta la superficie anterior y apófisis vocal de cada cartílago aritenoides. Es el mayor aductor de los pliegues vocales. Contiene una porción tiroepiglótica:
 - Son fibras que se extienden posterior y superiormente para insertarse en el pliegue ariepiglótico y a lo largo del margen epiglótico. Su contracción conduce a los cartílagos aritenoides hacia delante y abajo, aproximándolos al tiroides. El resultado es un acortamiento del ligamento vocal y la relajación de la membrana mucosa que lo cubre: el pliegue vocal (Ford y Bless, 1991).
 - Músculo vocal. La porción más medial del músculo tiroaritenoides, se extiende también desde la superficie interna del cartílago tiroides hasta la apófisis vocal del cartílago aritenoides, rodeando sus fibras al ligamento vocal. Su función es aductora de los pliegues vocales pero, una vez aproximados y juntos, constituye en el mayor tensor de los mismos.
- Músculo cricotiroideo. Está inervado por la rama externa del nervio laríngeo superior. Su función es muy relevante durante la deglución y consiste en aproximar entre sí al tiroides y al cricoides, haciendo bascular al primero hacia delante. También interviene en la fonación cuando se requiere una vibración de frecuencia muy aguda, pues el estiramiento que produce en los pliegues, consigue aumentar su tensión y reforzar la acción del músculo vocal (Tucker 1993) (Tabla 1.1.1.3.1).

	Tiroaritenoso	Interaritenoso	Cricoaritenoso	Cricoaritenoso	Cricotiroideo
			Lateral	Posterior	
Recurrente	x	x	x	x	
Laríngeo Externo					x
Abductor				x	
Aductor	x	x	x		x

Tabla 1.1.1.3.1 Musculatura laríngea intrínseca

1.1.1.4.- VASCULARIZACION LARINGEA

La vascularización de la laringe se realiza a expensas de las arterias tiroideas, origen de las laríngeas. La tiroidea superior es rama de la carótida externa; la tiroidea inferior procede del tronco tirocervical, rama de la arteria subclavia (Lacau St. Guily y Fardeau, 1983).

- La arteria laríngea superior, que nace de la tiroidea superior, atraviesa la membrana tirohioidea, pasa bajo la mucosa del canal faringo-laríngeo y desciende en dirección al músculo cricotiroideo donde termina. Se acompaña del nervio laríngeo superior, estando la arteria en situación subyacente al nervio, que discurre ligeramente superior al plano de la arteria. En su trayecto proporciona ramas ascendentes para la región epiglótica y ramas descendentes para los pliegues vocales.
- La arteria laríngea externa, también rama de la tiroidea superior, desciende verticalmente por fuera del cartílago tiroides para penetrar en la laringe perforando la membrana cricotiroidea. Irriga la parte subglótica de la laringe.
- La arteria laríngea inferior nace de la arteria tiroidea inferior. Ascende verticalmente y penetra el conjunto laringo-faríngeo pasando bajo el borde inferior del músculo constrictor inferior de la faringe.

El retorno venoso se realiza a través de las venas laríngeas que son tres a cada lado y acompañan a las arterias del mismo nombre siguiendo prácticamente el mismo trayecto. Acaban desembocando en la vena yugular interna mediante las venas tiroideas. La zona laríngea más inferior puede drenar la sangre venosa en la vena tiroidea inferior, que acaba directamente en la cava superior.

El drenaje linfático de la laringe se extiende por el territorio supraglótico con desarrollo abundante, mientras que el territorio subglótico tiene menor cantidad de linfáticos. La red supraglótica es densa, más rica a nivel de la epiglotis y está formada por capilares voluminosos. Desemboca principalmente en los ganglios del grupo cervical superior profundo. La red subglótica es menos densa y está formada por capilares más finos. Drena en los ganglios inferiores del grupo cervical superior profundo (Pernkopf, 1960).

1.1.1.5.- INERVACION LARINGEA. NERVIOS LARINGEOS

El recorrido de los nervios laríngeos recurrente y superior ha sido estudiado principalmente en el contexto en la cirugía del tiroides y de las disecciones clásicas en cadáver. La anatomía clásica de la laringe ha mantenido que el laríngeo recurrente inerva la musculatura intrínseca de la laringe excepto el cricotiroideo y aporta sensibilidad a glotis y subglotis mientras que el laríngeo superior da inervación motora al musculo cricotiroideo y aporta sensibilidad por encima del nivel del plano glótico. Este conocimiento clásico de la inervación de la laringe ha evolucionado hacia modelos más avanzados gracias a las investigaciones en microscopia y técnicas de neurociencia. Estos estudios han demostrado unas complejas relaciones entre los nervios que inervan la laringe. Actualmente la línea que separa la inervación aferente de los nervios laríngeos es mucho menos clara (McHanwell, 2008). Los nervios laríngeos presentan unas conexiones más complejas que la bien conocida anastomosis de Galeno, llegando a formar un plexo laríngeo en la superficie posterior de la laringe (McHanwell, 2008). Hay evidencias anatómicas que sugieren la posibilidad de que el laríngeo superior presente inervación motora para otros músculos además del cricotiroideo. Algunos de los músculos intrínsecos de la laringe presenta más de un vientre muscular y cada uno de los vientres musculares presenta nervios independientes que sugieren un control neural único para cada uno de ellos (Blitzer 2009).

Clásicamente, la inervación sensorial se ha establecido que es dependiente de la rama interna del laríngeo superior hasta el nivel de los pliegues vocales y dependiente del nervio recurrente por debajo, estableciendo un territorio de solapamiento en los propios pliegues vocales (McHanwell, 2008).

NERVIO LARÍNGEO SUPERIOR

El laríngeo superior es un nervio mixto que se desprende del nervio vago a nivel de la base del cráneo, una vez que ya ha abandonado el agujero yugular. El nervio desciende hacia la faringe y se divide en varias ramas terminales antes de penetrar en la laringe: la rama externa y la rama interna (Bannister, 1995).

La rama externa recibe también el nombre de nervio laríngeo externo. Esta rama ha sido considerada tradicionalmente como una rama motora, que contiene las fibras EVE

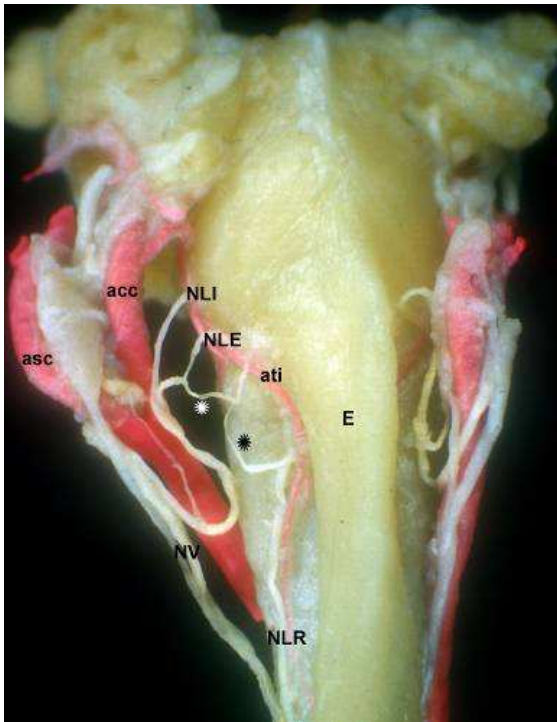


Figura 1.1.1.5.1 Visión dorsal de la laringe de la rata. Abreviaturas: NLE: nervio laríngeo externo; NLI: nervio laríngeo interno; NLR: nervio laríngeo recurrente; NV: nervio vago; E: esófago; acc: arteria carótida común; asc: arteria subclavia; ati: arteria tiroidea inferior. *: conexiones entre nervio laríngeo superior y nervio laríngeo recurrente (Pascual 2007).

del nervio laríngeo superior que tienen su origen real en el núcleo ambiguo y que inerva el músculo cricotiroides. El nervio es fácil de identificar porque continúa el trayecto descendente del tronco principal del nervio para terminar distribuyéndose por el músculo cricotiroides (Morrison, 1952; Wyke y Kirchner, 1976; Brodal, 1981; Sañudo y cols., 1999; Saper, 2000; Haines, 2003).

Aunque clásicamente el nervio laríngeo externo se ha descrito como un nervio puramente motor, existen algunos autores que, mediante estudios electrofisiológicos,

consideran que este nervio es un nervio mixto que contiene, además de las fibras eferentes viscerales especiales (EVE), fibras aferentes viscerales generales (AVG) que recogen la información sensitiva de un territorio pequeño y definido de la mucosa infraglótica (Maranillo y cols. 2003). Esta área tiene forma de diamante, es ventral y se extiende desde el borde inferior del cartílago tiroideos hasta el borde superior del primer anillo traqueal (Suzuki y Kirchner, 1969). Esta zona sería el único territorio de la región infraglótica inervado por el laríngeo superior (Suzuki y Kirchner, 1969). Los cuerpos celulares de las fibras AVG se encuentran en el ganglio inferior del nervio vago. Sus prolongaciones centrales se incorporan al tracto solitario y terminan en el núcleo del tracto solitario, a diferentes niveles y en distintos subnúcleos (Morrison, 1952; Wyke y Kirchner, 1976; Brodal, 1981; Saper, 2000; Haines, 2003).

La rama interna del nervio laríngeo superior recibe el nombre de nervio laríngeo interno, y se ha descrito como un nervio sensorial. El nervio entra en la laringe tras perforar la membrana tirohioidea, donde se divide en varias ramas que se distribuyen por la mucosa de la región supraglótica y seno piriforme. Este nervio contiene fibras AVG, aferentes viscerales especiales (AVE) y eferentes viscerales generales (EVG) (Pascual, 2007).

El soma neuronal de las fibras AVE se describe conteniendo en el ganglio inferior del nervio vago. Las prolongaciones centrales de estas neuronas se incorporan al tracto solitario e ingresan en el segmento más craneal del núcleo de este tracto. Estas fibras recogen la información gustativa de la epiglotis (Morrison, 1952; Wyke y Kirchner, 1976; Hamilton y Norgren 1984; Hanamori, 1989; Haines, 2003; Saper, 2000; Brodal, 1981).

A diferencia de la rama externa, se ha descrito que la rama interna contiene, además de las fibras sensitivas descritas, fibras EVG, es decir, preganglionares parasimpáticas. Los cuerpos celulares de estas fibras EVG tienen su origen real en el núcleo dorsal del vago, e inervan las glándulas seromucosas distribuidas en las regiones glótica y supraglótica (Morrison, 1952; Wyke y Kirchner, 1976; Brodal, 1981; Saper, 2000; Haines, 2003).

Por lo tanto, en el nervio laríngeo superior se han descrito cuatro componentes funcionales: EVE, EVG, AVG y AVE (Morrison, 1952; Wyke y Kirchner, 1976; Brodal, 1981; Saper, 2000; Haines, 2003).

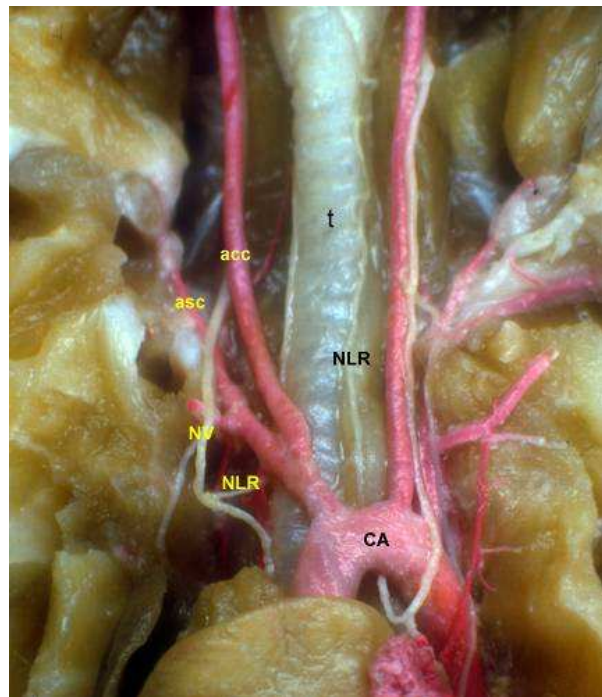
NERVIO LARÍNGEO RECURRENTE O INFERIOR

El laríngeo recurrente se desprende del nervio vago una vez que éste cruza la arteria subclavia, en el lado derecho, o el cayado aórtico, en el lado izquierdo. Ambos recurrentes ascienden hacia la laringe entre la tráquea y el esófago, íntimamente relacionados a la arteria tiroidea inferior (Morrison, 1952; Wyke y Kirchner, 1976). Las ramas en las que se dividen los nervios recurrentes a lo largo de su recorrido son muy variadas. En el momento de su recurrencia por debajo de la subclavia, en el caso del recurrente derecho y por debajo de la aorta, en el caso del izquierdo, dan ramas al plexo cardiaco profundo (Rouviere y Delmas, 2005). Durante su ascenso por el cuello también aportan ramas sensoriales y motoras a tráquea y esófago y antes de entrar en la laringe dan la inervación motora del músculo cricofaríngeo (Rouviere y Delmas, 2005). En la laringe aportan la inervación motora de todos los músculos intrínsecos excepto el cricotiroideo e inervación sensorial a glotis, subglotis y tráquea cervical (Rouviere y Delmas, 2005).

El laríngeo inferior es un nervio mixto, al igual que el laríngeo superior, presentando las mismas dos modalidades de fibras motoras que para el laríngeo superior (EVE, EVG), pero no las mismas modalidades de fibras sensitivas; el recurrente contiene fibras AVG pero no fibras AVE que son gustativas. La distribución de las fibras del laríngeo inferior acontece en la región infraglótica (Morrison, 1952; Wyke y Kirchner, 1976; Brodal, 1981; Saper, 2000; Haines, 2003).

El origen real de las fibras EVE del laríngeo inferior es el núcleo ambiguo. Varios autores han descrito este hecho mediante trabajos realizados en diversos animales de

experimentación: la rata (Hinrichsen y Ryan, 1981; Hisa y cols., 1985; Bieger y Hopkins, 1987; Saxon y cols., 1996), el gato (Nomura y Mizuno, 1983), el murciélago (Schweizer y cols., 1981), el visón y el hurón (Ranson y cols., 1995) y la oveja (Barazzoni y cols., 2005). Estas fibras inervan a todos los músculos intrínsecos de la laringe, excepto al músculo cricotiroideo (Morrison, 1952; Wyke y Kirchner,



(Morrison, 1952; Wyke y Kirchner, 1976; Haines, 2003; Kahle, 2003). Inervan, por tanto, los músculos cricoaritenoides posteriores, cricoaritenoides laterales, tiroaritenoides e interaritenoides.

Figura1.1.1.5.2 . Visión ventral de la tráquea de la rata en la que se puede observar el recorrido de los nervios laríngeos recurrentes izquierdo y derecho. Abreviaturas: NLR: nervio laríngeo recurrente; NV: nervio vago; CA: cayado aórtico; asc: arteria subclavia; acc: arteria carótida común; t: tráquea (Pascual 2007).

Las fibras EVG se han descrito clásicamente teniendo su origen real en el núcleo dorsal del vago, y van a inervar las glándulas seromucosas de la región infraglótica (Morrison, 1952; Wyke y Kirchner, 1976; Brodal, 1981; Saper, 2000; Haines, 2003). Sin embargo, no se ha descrito en ningún animal que el laríngeo inferior contenga este tipo de fibras. No se han encontrado neuronas marcadas en el núcleo dorsal del vago tras trazar el laríngeo inferior con HRP (Hinrichsen y Ryan, 1981; Schweizer y cols., 1981; Nomura y Mizuno, 1983; Ranson y cols., 1995). Únicamente en la oveja se ha descrito la presencia de alguna neurona marcada en el núcleo dorsal del vago, sin embargo los propios autores indican que este marcaje es muy escaso (5 neuronas), y sólo aparece en uno de los siete casos estudiados (Barazzoni y cols., 2005). Por otro lado, no se ha descrito la presencia de neuronas EVG marcadas en ningún otro territorio del tronco del encéfalo o de la médula espinal.

Clásicamente se ha descrito que las fibras AVG inervan la mucosa de la glotis y de la región infraglótica. Estas fibras tienen el cuerpo neuronal en el ganglio inferior del nervio vago. Sus prolongaciones centrales se incorporan en el tracto solitario para terminar en el núcleo del tracto solitario a diferentes niveles de dicho núcleo (Morrison, 1952; Wyke y Kirchner, 1976; Brodal, 1981; Saper, 2000; Haines, 2003).

El nervio recurrente forma varias anastomosis con el laríngeo superior con el nervio laríngeo superior. La rama posterior del nervio recurrente asciende para unirse a la rama descendente del laríngeo interno, además el asa de Galeno forma una comunicación directa entre estos dos nervios (McHanwell, 2008).

1.1.2.- ASPECTOS EMBRIOLOGICOS DEL DESARROLLO DE LA LARINGE

Embriológicamente la cavidad laríngea deriva de la faringe embrionaria. Los tejidos de la laringe proceden de las hojas ectodérmica, endodérmica y mesodérmica, constituyentes de los arcos branquiógenos segundo, tercero, cuarto y sexto (Tucker, 1993), por tanto la laringe presenta un revestimiento interno de origen endodérmico, pero los cartílagos y los músculos provienen del mesénquima de los arcos faríngeos cuarto y sexto.

ESBOZO LARINGEO

Los primeros indicios de la formación de la laringe aparecen en el embrión de unos 4-5 mm, durante la cuarta semana y alrededor del día 24. Del mesodermo de la pared ventral de la faringe, nace un tubérculo llamado primordio respiratorio, que al profundizar y elongarse constituye la fosa laringotraqueal y luego el tubo laringotraqueal (Tucker, 1993). El extremo distal de este tubo se dividirá en dos ramas bronquiales. Más tarde, alrededor del 26º día, se individualizará el tracto respiratorio del digestivo mediante la formación de un septum, delimitándose así las estructuras que serán la tráquea y el esófago (Narcy y cols., 1979). Se considera que la lámina epitelial laríngea es el verdadero inductor de la formación de la laringe, que guiará posteriormente la evolución del mesénquima de los arcos branquiógenos para que constituyan las estructuras cartilagosas y neuromusculares (Perrin y Perrin, 1985; Narcy y cols., 1979).

ESQUELETO LARÍNGEO

La mayor parte de la estructura del hueso hioides deriva de las modificaciones del segundo arco branquiogéno. Este se caracteriza porque su extremo dorsal da origen al estribo, a la apófisis estiloides y al ligamento estilohioideo, mientras que su extremo ventral se fusiona en la línea media con el arco contralateral, dando lugar a las astas menores y a la parte anterolateral del hioides. El resto del cuerpo y las astas mayores del hueso hioides derivan del tercer arco branquiogéno, que también se une al arco contralateral en el suelo de la faringe (Tucker, 1993; Davis y Nail, 1994).

Los arcos branquiogénos cuarto y sexto contribuyen a la formación de los cartílagos laríngeos y la musculatura intrínseca laríngea. El quinto arco es un vestigio que no participa en el desarrollo embrionario laríngea (Hamilton y cols., 1962; Zaw-tun y Burdi, 1985).

Entre las cuarta y quinta semanas, en la base del cuarto arco branquiogéno, la fosa laringotraqueal es deformada por la aparición de tres eminencias, una en su pared anterior, la eminencia hipobranquial, que dará lugar a la epiglotis primordial y dos semiesferas simétricas en la pared posterior, los cartílagos aritenoides (Tucker, 1993).

Entre estas dos prominencias se esboza una hendidura en forma de T, con la rama más larga hacia delante y con los bordes fusionados hasta la décima semana aproximadamente. Más tarde, alrededor de esta hendidura se formará el vestíbulo laríngea y la glotis, cuando a partir de los bordes libres de los aritenoides se desprendan los repliegues aritenoepiglóticos, los tubérculos cuneiformes y los

corniculados. Entre las semanas 10^a-11^a se desprenderán las adherencias epiteliales y se abrirá la hendidura formando el espacio glótico (Wustrow, 1970).

El cricoides procede del sexto arco branquiógeno y se origina antes del final de la cuarta semana, por modificación del primer anillo traqueal. Al principio es sólo un anillo abierto por detrás, ya que la placa del sello cricoideo se formará más tarde, a lo largo de los subsiguientes meses gestacionales (Tucker et al., 1977; Perrin y Perrin, 1985). Entre las semanas 8^a y 13^a se va desarrollando el hioides a partir del segundo y tercer arcos branquiógenos. Al mismo tiempo se van formando también las placas del cartílago tiroides a modo de dos láminas laterales que, procedentes del 4^o arco branquiógeno se fusionan en sentido ascendente. Aproximadamente en el centro se produce una condensación de mesénquima que se corresponde con la zona donde se desarrolla el tendón de la comisura anterior o quilla tiroidea (Wustrow, 1970; Narcy y cols., 1979).

MUSCULATURA LARÍNGEA

La musculatura de laringe se esboza a finales de la cuarta semana, pero los músculos sólo son delimitables al final del segundo mes. La musculatura laríngea no se sujeta a ningún elemento esquelético extralaríngeo, pues une entre sí a los cartílagos y procede de los mismos arcos branquiógenos cuarto y sexto (Wustrow, 1970). Sañudo (1987), considera que el origen de la musculatura intrínseca de la laringe humana está dispuesto en condensaciones mesenquimales como columnas celulares longitudinales, las cuales, atendiendo a su posición con relación a la cavidad laríngea, son laterales, anterior y posterior.

Del cuarto arco branquial deriva el músculo cricotiroideo. Del mesénquima de este arco también nace, pero hacia la parte posterior, el músculo constrictor faríngeo inferior. (Hast, 1972; Hast, 1978).

Los restantes músculos intrínsecos se originan en el sexto arco branquiógeno. Unos se sitúan en la parte posterior de glotis: los músculos cricoaritenoides laterales, los cricoaritenoides posteriores y el interaritenoides. Otros se dirigen hacia delante para insertarse en el cartílago tiroides, los tiroaritenoides. Durante la formación de dicho cartílago, en el tercer mes de vida embrionaria, los repliegues vocales son arrastrados hacia delante, desde los aritenoides hasta el vértice interno de la lámina tiroidea.

Simultáneamente se van constituyendo también los ventrículos de Morgagni, que progresivamente se irán ahuecando para delimitar mejor las bandas ventriculares y los repliegues vocales. El ligamento vocal se forma dentro de estos repliegues tiroaritenoides, por condensación de su mesoderma (Tucker, 1993).

La inervación de la musculatura intrínseca es realizada por los nervios laríngeos inferiores o recurrentes de cada lado, también derivados del sexto arco branquiógeno. Ambos nervios, al igual que la musculatura intrínseca, tuvieron que emigrar desde la región epicárdica en dirección cefálica, hasta ocupar su lugar en el interior laríngeo. Debido a la persistencia del ductus arterioso, el recurrente izquierdo conserva un asa larga que delata que tuvo que emigrar desde la parte superior del tórax hacia el interior de la laringe (Tucker, 1993). El nervio laríngeo superior procede del cuarto arco branquiógeno para inervar al músculo cricotiroideo.

El sistema vascular primitivo se modela inicialmente siguiendo la distribución de los arcos branquiales, a partir del mesodermo de cada uno. Cabe señalar que el nervio del cuarto arco o laríngeo superior, se coloca por delante de su arteria, mientras que el del sexto arco, el laríngeo inferior o recurrente, se localiza detrás de su arteria, lo que entrañará importantes consecuencias respecto a su trayecto en el adulto (Davis y Nail, 1994).

El epitelio de revestimiento del esbozo laríngeo, inicialmente es de tipo poliédrico embrionario y procede del endodermo. En el tercer mes del desarrollo embrionario aparecen los primeros elementos celulares ciliados en las bandas ventriculares y ventrículos de Morgagni (Tucker y Smith, 1962). Hacia el quinto mes, el epitelio de las cuerdas se transforma en escamoso estratificado no queratinizado (Tucker y Smith, 1976), este mismo tipo de epitelio cubrirá también la cara laríngea de la epiglotis. El resto de estructuras supraglóticas y subglóticas quedan recubiertas por epitelio pseudoestratificado de tipo respiratorio (Friedman y Ferlito, 1988).

Los elementos glandulares se desarrollan entre el tercer y quinto mes de gestación. En primer lugar aparecen sobre la cara laríngea de la epiglotis y las bandas ventriculares, para ir extendiéndose progresivamente hacia los ventrículos y la subglotis, respetando en todo momento a las cuerdas vocales, donde no se desarrollan glándulas. Sin embargo, algunos canales excretores de las glándulas ventriculares podrían extenderse hacia las cuerdas vocales, lo que permitiría explicar la existencia de quistes congénitos intracordales (Narcy y cols., 1979).

DESARROLLO LARINGEO

Entre el final del segundo mes y el comienzo del tercero, la laringe presenta ya su conformación definitiva. A partir de este momento crecerá e irá modificando su posición con relación al resto de estructuras de la cabeza y del cuello. Las dimensiones laríngeas pasan de unos 2.5 cm de altura en el segundo mes, hasta los 20 cm a los nueve meses (Perrin y Perrin, 1985).

En la especie humana, entre las semanas 23^a-25^a de gestación, la epiglotis se mantiene alta y solapada con el velo del paladar, reproduciendo así una distribución similar a la comentada para otros mamíferos de la escala filogenética, por un lado lo que será la vía respiratoria, con una continuidad entre las fosas nasales, laringe y pulmones, por otro, la vía digestiva superior, que transcurre por boca, faringe, senos piriformes y acaba en esófago (Wolfson et al., 1990). Mediante ultrasonidos se ha observado que entre la semana 33^a y la 35^a existe ya una coordinación eficiente entre la succión y la deglución, con una posición laríngea muy alta. Es después del segundo trimestre de gestación, cuando la laringe empieza a descender desde su elevada posición inicial, prácticamente en contacto con las coanas (Tucker, 1993). En el recién nacido a término encontramos patrones de succión, deglución y respiración completamente desarrollados y sincronizados (Arvedson y Rogers, 1998).

Durante el estadio fetal, la laringe experimenta un crecimiento en tamaño y un descenso respecto a su elevada posición inicial. A lo largo de la infancia continuará bajando hacia su posición final, que es alcanzada al terminar la adolescencia y cuya altura en el segmento cervical es variable según el sexo (Magriples y Laitman, 1987; Laitman y Reindenberg, 1993).

1.1.3.- FILOGENIA DE LA LARINGE

El interés por el desarrollo filogenético del aparato fonatorio y respiratorio comenzó bastante después de que Darwin publicara su tratado “El origen de las especies por medio de la selección natural, o la preservación de las razas favorecidas en la lucha por la vida”, en el último tercio del siglo XIX (Darwin, 1859). La base del conocimiento actual sobre la filogenia de la laringe se asienta sobre los estudios de Sir Victor Negus (Negus, 1949), posteriormente desarrollados por Wind (1970). Los primeros estudios comparativos que se realizaron fueron de tipo morfológico. Las investigaciones de carácter funcional que se realizaron más tarde, utilizaron mayoritariamente laringes humanas, salvo algunas excepciones en animales.

El conjunto de los elementos que van a constituir la laringe se inicia en los anfibios, cuando aparece la encrucijada aerodigestiva que sirve como válvula de cierre del aparato respiratorio en el acto de la deglución. Todas las demás funciones especializadas aparecen progresivamente en la escala filogenética, y es la última de ellas la fonación (Avellaneda, 2000).

Los primeros elementos que podemos identificar que están separando la vía aérea de la digestiva, se encuentran en los peces pulmonados como los protopterus unos arcaicos peces óseos que aparecieron durante el Periodo Devónico, en la segunda mitad de la



Figura 1.1.3.1 Protopterus

Era Primaria, hace unos 320 millones de años (Ciges, 1973) (Figura 1.1.3.1) en forma de pequeños haces musculares alrededor de la entrada de una pequeña bolsa, inicio del pulmón (Negus, 1957; Romer, 1963).

En los anfibios primitivos aparece un par de elementos hialinos situados lateralmente al sistema primitivo traqueobronquial. En los anfibios más evolucionados, los urodelos, que son anfibios con cuatro patas y cola en su estado adulto, como la salamandra, aparecen cartílagos laterales, que prefiguran los aritenoides, y un cartílago cricotraqueal (Fink, 1956). En estos animales, la posición de reposo de la laringe sigue siendo cerrada como adaptación a la vida acuática; abriéndose sólo para permitir la entrada de aire (Naifeh y cols., 1970). Poseen además músculos constrictores y dilatadores. En los anfibios anuros, los anfibios que en estado adulto tienen cuatro patas y carecen de cola, como la rana, las branquias existentes en el renacuajo desaparecen en el adulto y la respiración se hace únicamente pulmonar y cutánea. Su laringe está formada por un par de cartílagos semicirculares que se corresponden con los aritenoides, bien diferenciados, y un anillo completo que se corresponde con el cricoides, un sistema dilatador y constrictor más desarrollado, pero la tráquea es casi inexistente todavía (Negus, 1957; Romer, 1963). Posterolateralmente tiene un par de procesos bronquiales largos y delgados. Como sucede en los peces pulmonados, la respiración se efectúa mediante la inyección de un volumen de aire en los sacos pulmonares. No obstante, en los anfibios el ritmo respiratorio es mucho más elevado que en los peces, y la laringe es susceptible de producir sonidos.

Los reptiles superiores presentan por primera vez un cartílago anular rígido que, para cerrarlo, necesita un elemento móvil, describiéndose dos aritenoides que abren hacia delante. Los cocodrilidos tienen ya una envoltura rígida que será el cartílago

tiroides y aparece ya una tabicación muscular entre tórax y abdomen, esbozo del diafragma, que facilita una depresión torácica más acentuada durante la respiración. En los reptiles además aparece ya el hueso hioides. La respiración cutánea desaparece a favor de la pulmonar exclusiva y de la caja torácica, motor de dicha respiración. De forma paralela, la tráquea se desarrolla y se equipa con cartílagos, lo que evita su colapso respiratorio. Contrariamente a lo que ocurre en los anfibios, la renovación del aire pulmonar es incompleta, por lo que el aire inspirado se mezcla con el ya existente en los pulmones. Otra diferencia con los anfibios es que los reptiles producen escasos sonidos, a no ser un escaso silbido originado por el paso forzado del aire a través de una laringe casi cerrada, aunque algunos cocodrilos son capaces de desarrollar una especie de gruñidos. La laringe de los reptiles permanece todavía en una posición muy elevada y cercana a la boca. En algunos, por encima de los aritenoides existe un repliegue membranoso equivalente a la epiglotis primitiva. Con él, además de conseguir una nueva protección durante la deglución, se empieza a configurar el vestíbulo laríngeo, lo que significa un agrandamiento de las dimensiones intralaríngeas y un precedente necesario para la posterior formación de los repliegues vocales (Fink, 1962).

Las aves se sitúan fuera de la filiación que conduce de los reptiles a los mamíferos. Su laringe es parecida a la de los reptiles, pero carece de función vocal, si bien poseen un órgano vocal, la siringe, situada en el extremo caudal de la tráquea, es decir, en la bifurcación traqueal, y funciona gracias al paso de aire por ellas de manera análoga al funcionamiento de la laringe y las cuerdas vocales de los mamíferos (Ciges 1973). No todas las aves tienen siringe. La siringe (Figura 1.1.3.2) está formada principalmente por los cartílagos traqueales y bronquiales, los cuales se ensanchan para formar una caja de resonancia. Unidos a estos cartílagos se encuentran varios músculos externos, los cuales tienen la función de dilatar o reducir la luz del tubo de la siringe con el objeto de regular el aire. Puesto que la siringe se ubica donde la tráquea se bifurca

para formar los bronquios, más profundo que la laringe mamífero, muchos pájaros cantores pueden producir dos sonidos o más simultáneamente. Por la parte interna de los bronquios se encuentran uno o dos pares de membranas vibrátiles, llamadas membranas timpánicas, las cuales, dependiendo de su grosor y apertura, vibran de modo diferencial para producir los distintos sonidos.

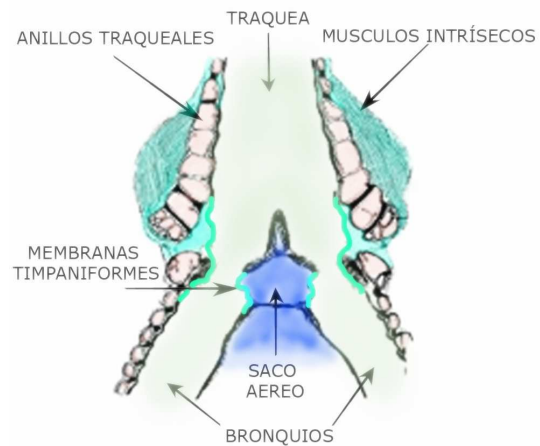


Figura 1.1.3.2 Siringe

En los mamíferos la laringe adquiere su máxima evolución. Los cetáceos, mamíferos acuáticos, tienen una laringe en posición retror nasal, que puede aislar completamente las vías respiratorias y digestivas. La epiglotis del mamífero está muy desarrollada, por lo que el olfato se puede mantener constante para poder comer y oler al mismo tiempo, sobre todo en herbívoros y felinos de caza nocturna. La epiglotis facilita la separación completa entre las vías aéreas y las digestivas, particularmente en los herbívoros, en los que el tubo laríngeo asciende bastante en la nasofaringe y la epiglotis es muy grande. En los carnívoros, la deglución se hace subiendo la laringe, que se adapta a la epiglotis, el hioides y la base de la lengua, Los aritenoides rotan ventralmente y se cierra el esfínter vocal por contractura muscular.

A medida que subimos en la escala filogenética y se adquiere la posición erecta, baja la laringe, disminuye el tamaño de la epiglotis y la propia laringe se hace vertical, situándose por debajo del hioides. La posición de la laringe condiciona igualmente el poder olfatorio, cuanto más alta mejor olfato y cuanto más baja menos poder olfatorio. Gracias a esta configuración, la mayoría de los mamíferos terrestres que dependen del olfato para comunicarse con el medio y pueden permanecer olfateando

mientras se alimentan, algo primordial para su supervivencia frente a los depredadores (Laitman, 1977; Reidenberg y Laitman, 1987; Tucker, 1993).

Los primates presentan escasas peculiaridades con relación a los demás mamíferos, aunque cabe destacar un desarrollo más importante de los pliegues vocales y de los vestibulares (Laitman, 1977; Lieberman, 1984; Tucker, 1993), sin duda en conexión con la braquiación, es decir, con la necesidad de traicionar con los brazos, función propia de especies arborícolas. En el ser humano se aprecia una diferencia fundamental y que concierne a la situación de la laringe. Efectivamente, con relación a la del chimpancé, la laringe del hombre adulto está colocada más caudal, por lo cual la epiglotis no alcanza el velo palatino, lo que imposibilita la ejecución simultánea de respiración y deglución y, en cambio, permite que puedan producirse fenómenos de falsa ruta alimentaria. La situación de la epiglotis en el recién nacido es similar a la del chimpancé experimentando luego con el desarrollo un descenso. Esta situación más baja de la laringe determina un aumento de volumen de la cavidad faríngea, lo que facilita enormemente las posibilidades de articulación del habla (Laitman y Reidenberg, 1993).

Elementos	Aritenoides	Cricoides	Epiglotis	Tiroides dividido	Tiroides único	Corniculados	Cuneiformes	Sacos aéreos	Laringe Descendida
Dipneos	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Urodelos	Sí	No	No	No	No	No	No	No	No
Anuros	Sí	Sí	No	No	No	No	No	No	No
Reptiles terrestres	Sí	Sí	+/-	No	No	No	No	No	No
Mamíferos que ponen huevos	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	No	No	No
Marsupiales	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	No
Mamíferos placentarios	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No
Primates arbóreos	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No
Homo	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí

Tabla 1.1.2.1. Secuencia de aparición filogenética de los elementos laríngeos (Fink, 1975; Bermúdez de Alvear, 2000) .Columna izquierda: las especies por orden taxonómico de distancia al hombre. Fila superior: la secuencia en la que presumiblemente se fueron añadiendo las principales estructuras; esta secuencia fue deducida por los estudios morfológicos de Negus (1931), Starck y cols. (1960) y Wind (1970).

1.1.4.- CENTROS NERVIOSOS DEL CONTROL LARÍNGEO

1.1.4.1.- EL NÚCLEO AMBIGUO: ORGANIZACIÓN GENERAL Y DE LAS NEURONAS DE LA MUSCULATURA INTRÍNSECA LARÍNGEA

FILOGENIA

La organización funcional y topográfica de las motoneuronas en el núcleo ambiguo refleja la evolución de las funciones de la laringe, desde la primaria función respiratoria a las funciones más avanzadas de vocalización (Malmgren y Gacek, 2009).

Los reptiles son la primera especie en la que el núcleo ambiguo se diferencia anatómicamente como una entidad individualizada, separándose las neuronas eferentes del vago en los núcleos dorsal y ventral, siendo este último el denominado núcleo ambiguo (Barbas-Henry y Lohman, 1988). En los mamíferos, la adición de más capacidades complejas de comunicación y expresión hacen que el núcleo ambiguo proyecte de una manera muy organizada y precisa a estructuras supradiafragmáticas incluyendo la laringe, faringe, paladar blando, esófago, bronquios y corazón (Kalia y Mesulam, 1980 ab).

RETROSPECTIVA HISTÓRICA DEL NÚCLEO AMBIGUO

El núcleo ambiguo se identificó como el núcleo ventral de origen real del nervio vago a mediados del siglo XIX, definiéndose como una columna de células embebida en la formación reticular ventrolateral de la médula oblongada, situada caudalmente al núcleo motor del facial y hasta la oliva inferior, y cuyas fibras eran conducidas por el nervio vago (Van Gehuchten, 1898; Bunzl-Federn, 1899, Molhant, 1912; Ramón y Cajal,

1909). Sin embargo fue Krause (1876) quién le otorgó el nombre de núcleo ambiguo por lo “indefinido” de su estructura al hallarse sus neuronas entremezcladas con las de la formación reticular, aunque este autor negó su conexión con el nervio vago.

Aunque Ramón y Cajal (1909) ya describió que los axones de las neuronas del núcleo ambiguo no sólo eran conducidas por el nervio vago sino también por los nervios glossofaríngeo y accesorio, es mucho más tarde, gracias a los trabajos llevados a cabo por Lawn (1966ab), cuando se incluyeron definitivamente las células motoras de origen real del nervio glossofaríngeo entre las que constituyen el núcleo ambiguo. Así, se describe el núcleo ambiguo como el origen de los nervios motores que inervan la musculatura visceral especial relacionada con funciones vitales tales como la respiración, deglución o fonación.

Sin embargo, ya desde principios del siglo XX diversos autores describieron que una parte del núcleo ambiguo podría contener neuronas con una funcionalidad diferente, en lo que denominaron formación externa (Marinesco y Parhon, 1907; Hudovering, 1908). Más tarde se confirmó que, efectivamente, el núcleo ambiguo presenta una subdivisión ubicada ventrolateralmente al núcleo ambiguo “clásico”, formada por neuronas preganglionares parasimpáticas que constituyen el origen real de las fibras vagales cardiacas (Kosaka, 1909; Nosaka y cols., 1979; Bieger y Hopkins, 1987).

MODELOS ANIMALES Y TÉCNICAS EMPLEADAS EN LOS ESTUDIOS DE LA REPRESENTACIÓN LARÍNGEA DENTRO DEL NÚCLEO AMBIGUO

Mediante técnicas diversas, y en diferentes modelos animales, se ha descrito la

organización morfofuncional de las motoneuronas del núcleo ambiguo que inervan los diferentes músculos intrínsecos de la laringe.

Son varios los órdenes de animales estudiados y varias las técnicas empleadas para el análisis de la representación laríngea dentro del núcleo ambiguo. Los animales estudiados han sido: carnívoros (Szentágothai 1943; Gacek,1975; Kalia y Mesulam 1980ab; Lobera y cols., 1981; Yoshida y cols., 1982; Pásaro y cols., 1983; Davis y Nail, 1984; Portillo y Pásaro, 1988), lagomorfos (Lawn, 1966ab; Davis y Nail, 1984), roedores (Hinrichsen y Ryan, 1981; Lobera y cols., 1981; Pásaro y cols., 1981; Bieger y Hopkins, 1987; Basterra y cols., 1987; Portillo y Pásaro, 1988; Saxon y cols., 1996) y quirópteros (Schweizer y cols., 1981).

Las técnicas empleadas en estos estudios han incluido: lesiones estereotáxicas (Szentágothai, 1943), sección nerviosa y degeneración walleriana (Lawn, 1966ab; Davis y Nail, 1984), trazado con aminoácidos tritiados, peroxidasa del rábano picante (*horseradish peroxidase*, HRP) y conjugados, o trazadores fluorescentes (Gacek, 1975; Kalia y Mesulam, 1980ab; Schweizer y cols., 1981; Lobera y cols., 1981; Hinrichsen y Ryan, 1981; Pásaro y cols., 1981; Yoshida y cols., 1982; Pásaro y cols., 1983; Davis y Nail, 1984; Basterra y cols., 1987; Portillo y Pásaro, 1988; Saxon y cols., 1996).

ORGANIZACIÓN DEL NÚCLEO AMBIGUO

Atendiendo a la distribución somatotópica de los músculos intrínsecos de la laringe, según sean éstos músculos abductores o músculos aductores, Gacek (1975) describió una distribución somatotópica dorsoventral de la musculatura laríngea aductora/abductora dentro del núcleo ambiguo. Así, las motoneuronas que inervan la

musculatura abductora, es decir, el músculo cricoaritenideo posterior, se localizan en la parte ventral del núcleo ambiguo; mientras que las motoneuronas que inervan la musculatura aductora, es decir, las de los músculos tiroaritenideo, cricoaritenideo lateral y aritenideo, se sitúan en la parte dorsal del núcleo ambiguo.

Por otro lado, otros autores consideran el núcleo ambiguo como una columna continua sin segregación dorsoventral aductora/abductora (Szentágothai, 1943; Lawn, 1966ab; Hinrichsen y Ryan, 1981; Schweizar y cols., 1981; Lobera y cols., 1981; Pásaro y cols., 1981).

Fueron Bieger y Hopkins (1987), en su ya clásica publicación quienes establecieron el que hasta hoy es el modelo de representación de la laringe en el núcleo ambiguo más reconocido. Así, establecieron que esta representación de la laringe en el núcleo ambiguo se sitúa en la región más caudal del mismo (Lawn, 1966a; Bieger y Hopkins, 1987). De ahora en adelante nos referiremos exclusivamente a esta representación laríngea en el núcleo ambiguo, para desarrollar las diferentes descripciones que se han realizado de este territorio del núcleo.

La organización viscerotópica del núcleo ambiguo está constituida por dos divisiones principales (Bieger y Hopkins, 1987):

A) División ventral. Es la formación externa, formada por neuronas eferentes preganglionares parasimpáticas cardíacas.

B) División dorsal. Está formada por las neuronas eferentes que inervan los músculos estriados de la laringe, la faringe y el esófago. Esta división, a su vez, puede ser dividida en tres subdivisiones organizadas rostrocaudalmente:

- **Formación compacta:** Es la subdivisión más rostral. Proyecta a todos los niveles del esófago, es decir, es la subdivisión esófagomotora.
- **Formación semicompacta:** Es la subdivisión intermedia que se extiende caudalmente a la formación compacta, aunque algunas de las neuronas que inervan el músculo cricotiroideo se sitúan en el mismo plano que la formación compacta. Contiene las neuronas que inervan los músculos constrictores de la faringe y el músculo cricotiroideo.
- **Formación laxa:** Es la subdivisión más caudal. Contiene las motoneuronas que proyectan sus fibras para inervar a los músculos intrínsecos de la laringe, con excepción del músculo cricotiroideo.

Por otro lado, en la literatura anterior a estos autores, se encuentran términos como “núcleo retrofacial” y “núcleo retroambiguo”, usados de distinta forma dependiendo de qué autor se trate. Bieger y Hopkins (1987) trataron de unificar los criterios con los que clasificar a estos dos núcleos. El término de núcleo retrofacial se ha utilizado para designar a la parte más rostral del núcleo ambiguo y corresponde, por lo tanto, si no en su totalidad si mayoritariamente, a la formación compacta del núcleo ambiguo (Bieger y Hopkins, 1987). El núcleo retroambiguo se sitúa en una posición análoga a la de la columna intermediolateral de la médula espinal, pero en la médula oblongada, y por ello la correspondencia es clara con las motoneuronas laríngeas caudales de la formación laxa y algunas de las células cardiomotoras de la formación externa (Kalia y Mesulam, 1980ab; Bieger y Hopkins, 1987).

ORGANIZACIÓN SOMATOTÓPICA DEL NÚCLEO AMBIGUO

En cuanto a la representación somatotópica individualizada de cada músculo en el núcleo ambiguo, el patrón general describe una organización rostrocaudal. El patrón para cada uno de los músculos intrínsecos laríngeos se estableció por primera vez en el año 1943 mediante experimentos de degeneración nerviosa tras lesiones estereotáxicas teniendo como modelo animal el gato y el perro (Szentágothai, 1943). Tras la lesión eléctrica realizada en el tronco del encéfalo se observaba en qué músculos laríngeos se producía la degeneración de las placas motoras. De este modo se comprobó que el músculo cricotiroideo tiene sus motoneuronas en la posición más rostral, seguido en dirección caudal por las neuronas del músculo cricoaritenideo posterior, las del tiroaritenideo, las del cricoaritenideo lateral y por último las del músculo aritenideo (Szentágothai, 1943). Esta organización rostrocaudal en el que las neuronas del músculo cricotiroideo son las más rostrales, y están ubicadas en la formación semicompacta (Bieger y Hopkins, 1987), ha sido confirmada en muchos trabajos posteriores (Gacek, 1975; Lawn, 1966ab; Hinrichsen y Ryan, 1981; Schweizhar y cols., 1981; Yoshida y cols., 1982; Pásaro y cols., 1983; Davis y Nail, 1984; Basterra y cols., 1987; Portillo y Pásaro, 1988).

Sin embargo, no hay tanta unanimidad en cuanto a la distribución somatotópica del resto de las motoneuronas correspondientes a los demás músculos intrínsecos de la laringe. Por un lado, se describen que las neuronas que inervan el músculo cricoaritenideo posterior son las más caudales del núcleo ambiguo (Hinrichsen y Ryan, 1981), mientras que otros autores describen a estas neuronas situadas inmediatamente caudales a las que inervan el músculo cricotiroideo (Szentágothai, 1943; Yoshida y cols., 1982; Davis y Nail, 1984). También hay autores que han descrito las neuronas del músculo cricoaritenideo posterior dispersas entre las poblaciones de

neuronas que inervan el músculo tiroaritenoso o el cricoaritenoso lateral o solapando con ambas poblaciones, aunque siempre inmediatamente caudales a las neuronas que inervan el músculo cricotiroides (Davis y Nail, 1984; Yoshida y cols., 1982; Basterra y cols., 1987).

Hay otros autores que han descrito dos poblaciones de motoneuronas que inervan el músculo cricoaritenoso posterior, separadas entre sí, de forma que cada una es una población discreta. Una de estas poblaciones es caudal y se encuentra solapada en extensión rostrocaudal con las poblaciones de los músculos tiroaritenoso y cricoaritenoso lateral; la otra población, más rostral, solapa con las neuronas del músculo cricotiroides (Pásaro y cols., 1983; Portillo y Pásaro, 1988) Gacek (1975) también encontró esta distribución dual de neuronas que inervan el músculo cricoaritenoso posterior. Una población se sitúa en la parte rostral, lo que él mismo llama núcleo retrofacial, y la otra población se sitúa en la parte caudal, en el núcleo ambiguo.

Con respecto a la representación ipsilateral, contralateral o bilateral de los músculos intrínsecos de la laringe en la médula oblongada, una amplia mayoría de autores han descrito una representación ipsilateral (Lawn, 1966ab; Hinrichsen y Ryan, 1981; Schweizer y cols., 1981; Lobera y cols., 1981; Pásaro y cols., 1983; Yoshida y cols., 1982; Davis y Nail, 1984; Basterra y cols., 1987; Portillo y Pásaro, 1988). Sin embargo, algunos autores han descrito una representación bilateral de todos los músculos laríngeos en la médula oblongada de la rata (Pásaro y cols., 1981; Lobera y cols., 1981). Otros autores han descrito, en el gato, que los músculos aritenoso y cricoaritenoso posterior tienen una representación contralateral en el núcleo ambiguo (Gacek, 1975).

CUANTIFICACION DEL NUMERO DE NEURONAS QUE COMPONEN EL NUCLEO AMBIGUO

Existen diferentes trabajos realizados en diferentes animales de experimentación en los que se describe el número y tipos de motoneuronas laríngeas, en los que se observa una gran variabilidad tanto intraespecífica como interespecífica (Pásaro y cols., 1983; Davis y Nail, 1984; Lobera y cols., 1981; Gacek, 1975; Lawn, 1966a; Hinrichsen y Ryan, 1981; Portillo y Pásaro, 1988; Pásaro y cols., 1981; Bieger y Hopkins, 1987; Ranson y cols., 1995; Saxon y cols., 1996; Schwiezer y cols., 1981; Basterra y cols., 1987;) (Tablas 1.1.4.1.1-1.1.4.1.8).

Con respecto al número de neuronas, se ha descrito en el gato 220 neuronas laríngeas en el núcleo ambiguo, sin detallar el número de neuronas que inervaban cada músculo intrínseco laríngeo (Lobera y cols., 1981). Otros autores sí que han descrito el número de neuronas que inervaban cada músculo intrínseco laríngeo en el gato. De esta manera, se ha descrito que en las dos poblaciones de neuronas descritas en el gato hay una media de 133 neuronas pertenecientes a la población localizada en los dos tercios caudales de la representación laríngea del núcleo ambiguo, que proyecta a los músculos cricoaritenideo lateral, tiroaritenideo y cricoaritenideo posterior (Pasaro y cols., 1983). En la población de motoneuronas situada en el tercio rostral de la representación laríngea del núcleo ambiguo, que proyectan a los músculos cricoaritenideo lateral y cricotiroideo se ha descrito una media de 113 neuronas. Por tanto el número total de neuronas laríngeas en el gato adulto es de 246 neuronas (Pasaro y cols., 1983). Otros autores, también en el gato adulto, detallaron que la media de neuronas que inervan el cricotiroideo era 141; la media de neuronas que inervan el tiroaritenideo son 170 y la del cricoaritenideo lateral son 112, lo que haría un total de 534 neuronas en el núcleo ambiguo (Davis y Nail, 1984). En cuanto al

número de neuronas encontradas en el gato recién nacido, se ha descrito una media de 100 neuronas que inervan el cricoaritenideo posterior, una media de 200 neuronas inervando el cricotiroidoideo, una media de 50 neuronas que inervan el músculo tiroaritenideo, una media de 35 neuronas que inervan el cricoaritenideo lateral y 150 neuronas que inervan el músculo aritenideo. Esto supone que el número total de neuronas del núcleo ambiguo que inervan los músculos intrínsecos laríngeos en el gato recién nacido es de 535 neuronas (Gacek, 1975) (Tabla 1.1.4.1.1).

AUTOR	TÉCNICA	NÚMERO DE NEURONAS
Gacek (1975)	HRP en músculos intrínsecos	CT: 200; CAP: 100; TA: 50; CAL: 35; A: 150. TOTAL: 535
Lobera y cols. (1981)	HRP en músculos intrínsecos	TOTAL: 220
Pásaro y cols. (1983)	HRP en músculos intrínsecos	CT : 113 ; CAP : 189 ; CAL-TA: 133. TOTAL : 246
Davis y Nail (1984)	HRP en músculos intrínsecos	CAP: 111; CT: 141; TA: 170; CAL: 112. TOTAL: 534

Tabla 1.1.4.1.1. Diversos estudios sobre el número de neuronas laríngicas realizados en el gato. Se indican, para cada estudio, los autores y años del estudio, la técnica empleada, así como el número de neuronas laríngicas encontradas en el núcleo ambiguo, indicando tanto el número total como el número de neuronas del núcleo ambiguo que inervan cada músculo intrínseco de la laringe.

Abreviaturas: HRP: peroxidasa de rábano picante; CT: músculo cricotiroidoideo; CAP: músculo cricoaritenideo posterior; CAL: músculo cricoaritenideo lateral; TA: músculo tiroaritenideo; A: músculo aritenideo.

Lawn (1966b), en el conejo, describió la existencia de 300 neuronas en la formación difusa del núcleo ambiguo, es decir, en la parte laringomotora del núcleo. A su vez, también describió la existencia de 50 neuronas en la columna medial de la formación compacta, es decir, neuronas que inervan al músculo cricotiroidoideo. Más tarde, Davis y Nail (1984), también en el conejo, describieron 178 neuronas en el núcleo ambiguo que inervaban el músculo cricoaritenideo posterior, 257 neuronas que inervaban el

tiroaritenideo, 261 neuronas que inervaban el cricoaritenideo lateral y, por último, 101 neuronas que inervaban el músculo cricotiroideo (Tabla 1.1.4.1.2).

AUTOR	TÉCNICA	NÚMERO DE NEURONAS
Lawn (1966b)	Sección de NLR, NLS, tronco del vago y glossofaríngeo (degeneración neuronas)	FL: 300. Col Med (CT): 50
Davis y Nail (1984)	HRP en músculos intrínsecos	CAP: 178; CT: 101; TA: 257; CAL: 261

Tabla 1.1.4.1.2. Diversos estudios sobre el número de neuronas laríngeas realizados en el conejo. Se indican, para cada estudio, los autores y años del estudio, la técnica empleada, así como el número de neuronas laríngeas encontradas en el núcleo ambiguo, en alguna división de éste, ya sea de modo general o dependiendo de a qué músculo intrínseco inerven.

Abreviaturas: NLR: nervio laríngeo recurrente; NLS: nervio laríngeo superior; HRP: peroxidasa de rábano picante; CT: músculo cricotiroideo; CAP: músculo cricoaritenideo posterior; CAL: músculo cricoaritenideo lateral; TA: músculo tiroaritenideo; FL: formación laxa del núcleo ambiguo; Col Med: columna medial de la formación semicompacta del núcleo ambiguo.

En la rata han sido numerosos los trabajos que describen el número de neuronas en el núcleo ambiguo, y todos ellos son bastante coincidentes en cuanto a su descripción. Así, Hinrischen y Ryan (1981) describieron entre 24 y 175 neuronas inervando el músculo cricotiroideo, entre 17 y 166 neuronas inervando el músculo cricoaritenideo posterior y entre 49 y 109 neuronas inervando los músculos tiroaritenideo y cricoaritenideo lateral. Portillo y Pásaro (1988) describieron unos números muy similares: entre 41 y 90 neuronas inervando el músculo cricotiroideo, entre 24 y 90 neuronas inervando el músculo cricoaritenideo posterior, entre 28 y 76 neuronas inervando el músculo tiroaritenideo y 30 neuronas inervando el músculo cricoaritenideo lateral.

AUTOR	TÉCNICA	NÚMERO DE NEURONAS
Hinrichsen y Ryan (1981)	HRP en músculos intrínsecos	CT: 24-175; CAP: 17-166; CAL-TA: 49-109
Bieger y Hopkins (1987)	HRP en ganglio supranodoso del nervio vago	FL:140; FSC: 170; FE: 100
Pásaro y cols.(1981)	HRP en músculos intrínsecos de la laringe, faringe y paladar blando	NA: 100-300
Portillo y Pásaro (1988)	HRP, DY o TB en músculos intrínsecos de la laringe	CT: 41-90; CAP: 24-90; TA: 28-76; CAL: 30

Tabla 1.1.4.1.3. Estudios sobre el número de neuronas laríngeas realizados en la rata. Se indican, para cada estudio, los autores y años del estudio, la técnica empleada, así como el número de neuronas laríngeas encontradas en el núcleo ambiguo, en alguna división de éste ya sea de modo general o dependiendo de a qué músculo intrínseco laríngeo inervan.

Abreviaturas: NLR: nervio laríngeo recurrente; NLS: nervio laríngeo superior; HRP: peroxidasa de rábano picante; X supranodoso: gánglio supranodoso del nervio vago; X cervical: gánglio cervical del nervio vago; CT: músculo cricotiroideo; CAP: músculo cricoaritenoides posterior; CAL: músculo cricoaritenoides lateral; TA: músculo tiroaritenoides; A: músculo aritenoides; DY: Diamino Yellow; TB: True Blue; WGA: Aglutinina del Germen de Trigo; FL: formación laxa del núcleo ambiguo; FSC: formación semicompacta del núcleo ambiguo; FE: formación externa; NA: núcleo ambiguo.

Existen otros dos trabajos realizados en la rata en los que no se hace distinción alguna de las neuronas que inervan cada músculo, sino que se describe de modo general el número de neuronas del núcleo ambiguo. De esta manera, se han descrito un número de entre 100 y 300 neuronas en la representación laríngea del núcleo ambiguo (Pásaro y cols., 1981), o un número de 140 neuronas en la formación laxa del núcleo ambiguo, que inerva todos los músculos intrínsecos laríngeos excepto el cricotiroideo, así como 170 neuronas en la formación semicompacta, que inerva el músculo cricotiroideo y la musculatura faríngea (Bieger y Hopkins, 1987) (Tabla 1.1.4.1.3.).

En 1995, Ranson describió el número de neuronas marcadas en el núcleo ambiguo tras el trazado de los nervios nervio laríngeo recurrente y nervio laríngeo superior con HRP conjugada con WGA, en el visón y en el hurón. En el visón describió una media de

138 neuronas en el núcleo ambiguo tras el trazado del nervio laríngeo superior y de 140 neuronas tras el trazado del nervio laríngeo recurrente. En el hurón describió una media de 145 neuronas en el núcleo ambiguo tras el trazado del nervio laríngeo superior y de 190 neuronas tras el trazado del nervio laríngeo recurrente (Tabla 1.1.4.1.4).

AUTOR	ANIMAL	TÉCNICA	NUMERO DE NEURONAS			
Schweizer y cols. (1981)	Murciélago	HRP en músculo CT y en NLR	SLN: 500. RLN: 700			
Ranson y cols. (1995)	Visón. Hurón	WGA-HRP en NLS y NLR	Hurón		Visón	
			NLS	NLR	NLS	NLR
			265	190	232	140
			NA:145	NA	NA:138	NA
		NDV:39		NDV:46		
Hopkins y cols. (1984)	Cerdo neonato	HRP en rama cervical del vago	NDV: + de 1000 NA: + de 1000 ipsilat			

Tabla 1.1.4.1.4. Diversos estudios sobre el número de neuronas laríngeas. Se indican, para cada estudio, los autores y años del estudio, el animal y la técnica empleados, así como el número de neuronas laríngeas encontradas en el núcleo ambiguo, en alguna división de éste.

Abreviaturas: NLR: nervio laríngeo recurrente; NLS: nervio laríngeo superior; HRP: Peroxidasa de Rábano Picante; CT: músculo cricotiroideo; WGA: Aglutinina del Germen de Trigo; NDV: núcleo dorsal del vago; NA: núcleo ambiguo.

MORFOLOGIA DE LAS NEURONAS DEL NUCLEO AMBIGUO

En cuanto a la morfología de las neuronas del núcleo ambiguo, tres han sido las formas descritas en todos los animales estudiados: neuronas multipolares, piramidales y fusiformes (Tablas 1.1.4.1.5-1.1.4.1.8). Estas neuronas han sido descritas de varios tamaños: los autores que describieron en el gato dos tipos de poblaciones

diferenciadas de neuronas que inervaban el músculo cricoaritenideo posterior fundamentaban esta distinción fundamentalmente en el tamaño y morfología de sus neuronas. Así, la población localizada en los dos tercios caudales de la representación laríngea del núcleo ambiguo esta agrupada de manera dispersa, y sus neuronas presentan morfología multipolar de hasta 60 μm de diámetro, fusiforme de 20-23 μm de diámetro y piramidal. La población situada en el tercio rostral de la representación laríngea del núcleo ambiguo consta de neuronas de morfología multipolar, de hasta 40 μm de diámetro, y fusiforme (Pasaro et al, 1983). Gacek en 1975 también apuesta por esta distribución bimodal, basándose en el tamaño de las neuronas de ambas poblaciones, ya que la población rostral, o núcleo retrofacial, tiene neuronas más pequeñas que las de la población caudal o núcleo ambiguo. (Gacek, 1975).

AUTOR	TÉCNICA	FORMA	TAMAÑO(μm)
Gacek 1975	HRP en músculos intrínsecos	DivDors : multipolares DivVent : multipolares NRF : fusiformes	+ grandes que las de la DivVent + pequeñas que las de la DivDors Pequeñas y medianas
Kalia y Mesulam 1980	HRP en músculos intrínsecos, mucosa y visceras	Multipolares	40-50
Lobera y cols. 1981	HRP en músculos intrínsecos	Multipolares Fusiformes Piramidales	60 20-30 40
Pásaro y cols. 1983	HRP en músculos intrínsecos	CT : Multipolares Fusiformes CAP : 2poblaciones Multipolares Multipolares CAL-TA : Multipolares	20-36 (26) 20-36 (26) 16-40 (24) 24-60 (41) 20-60 (49.2)

		Fusiformes	20-30
		Piramidales	40
Davis y Nail 1984	HRP en músculos intrínsecos		CAP:15-24.4 CT: 23-33 TA: 33 CAL: 33

Tabla 1.1.4.1.5. Diversos estudios sobre la morfología de las neuronas laríngeas realizados en el gato. Se indican, para cada estudio, los autores y años del estudio, la técnica empleada, así como la forma y el tamaño de las neuronas laríngeas encontradas en el núcleo ambiguo, en alguna división de éste o dependiendo de a qué músculo intrínseco laríngeo inervan.

Abreviaturas: HRP: peroxidasa de rábano picante; DivDors: división dorsal del núcleo ambiguo; DivVent: división ventral; CT: músculo cricotiroideo; CAP: músculo cricoaritenideo posterior; CAL: músculo cricoaritenideo lateral; TA: músculo tiroaritenideo; NRF: núcleo retrofacial.

También en el gato, Davis y Nail (1984) encontraron que las neuronas que inervan los músculos cricoaritenideo posterior, de morfología fusiforme u ovoide, y cricotiroideo, son sensiblemente más pequeñas (23,6 y 26,4 μm de diámetro) que las neuronas que inervan los músculos tiroaritenideo y cricoaritenideo lateral (31,7 μm de diámetro), cuya morfología es en su mayoría multipolar. Las neuronas con morfología fusiforme serían neuronas dilatadoras de la laringe, mientras que las neuronas multipolares serían constrictoras de la laringe. Lobera y cols. (1981) describieron, también en el gato, neuronas laríngeas cuya morfología variaba desde neuronas multipolares grandes, de entre 20 y 60 μm de diámetro, fusiformes pequeñas, de entre 20 y 30 μm de diámetro, y piramidales medianas, de 40 μm de diámetro (Tabla 1.1.4.1.5).

En la rata son numerosos los estudios dedicados al conocimiento de la morfología y tamaño de las neuronas del núcleo ambiguo. Así, Lobera y cols. (1981) describieron neuronas multipolares medianas, de 25 μm de diámetro, y neuronas fusiformes pequeñas de 16 μm de diámetro, al igual que Pásaro y cols. (1981), que describieron neuronas multipolares de 22 μm de diámetro mayor y 17 μm de diámetro menor, y

neuronas fusiformes de 29 μm de diámetro mayor y 11 μm de diámetro menor. Saxon y cols. (1996) describieron neuronas multipolares grandes, de 40 μm de diámetro mayor y 30 μm de diámetro menor, y algunas motoneuronas pequeñas, de 15 μm de diámetro mayor y 5 μm de diámetro menor. Ambos tipos de neuronas son descritas como motoneuronas α , ya que, según los autores del estudio, las pequeñas no responden a la forma de las motoneuronas γ descritas previamente en la literatura. En cuanto a la descripción del tamaño y morfología de las distintas neuronas que inervan a los diferentes músculos laríngeos, únicamente se encuentran dos trabajos en la literatura consultada que realizan esta descripción en la rata. Por un lado, Hinrichsen y Ryan (1981) describen únicamente que existen dos tipos de neuronas que inervan el músculo cricoaritenideo posterior, unas grandes, de 830 μm^2 de área y otras pequeñas, de 400 μm^2 . Por otro lado, Portillo y Pásaro (1988), describieron a todas las neuronas de morfología multipolar, pero de diferentes tamaños, de manera que las neuronas que inervan el músculo cricotiroideo tienen entre 15 y 30 μm de diámetro, las que inervan el cricoaritenideo posterior tienen entre 15 y 25 μm de diámetro y las que inervan los músculos tiroaritenideo y cricoaritenideo lateral tienen entre 25 y 32 μm de diámetro. Por último, Bieger y Hopkins (1987), describieron en el núcleo ambiguo neuronas de tamaño medio, sin especificar la dimensión exacta, y neuronas pequeñas, de entre 15 y 20 μm de diámetro, en la formación externa del núcleo ambiguo (Tabla 1.1.4.1.6.).

AUTOR	TÉCNICA	FORMA	TAMAÑO(μm)
Hinrichsen y Ryan (1981)	HRP en músculos intrínsecos, NLS y NLR		PCA: grandes (830 μm^2), pequeñas (400 μm^2)
Bieger y Hopkins (1987)	HRP en Xsupranodoso, Xcervical	Xsupranodoso: FL: Multipolares FE: Multipolares Xcervical: NA: Multipolares	Medio Medio Medio

		FE: Multipolares	15-20
Lobera y cols. (1981)	HRP en músculos intrínsecos	Rata: Multipolares Fusiformes	25 16
Pásaro y cols (1981)		Multipolares Fusiformes	17x22 11x29
Portillo y Pásaro (1988)	HRP, DY o TB en músculos intrínsecos	CT: Multipolares CAP: Multipolares TA-CAL Multipolares	20 (15-30) 15-25 25-32
Saxon y cols. (1996)	HRP-WGA en NLR	Multipolares Motoneur peq	41.7 x 30.2 15 x 5

Tabla 1.1.4.1.6. Diversos estudios sobre la morfología de las neuronas laríngeas realizados en la rata. Se indican, para cada estudio, los autores y años del estudio, la técnica empleada, así como la forma y el tamaño de las neuronas laríngeas encontradas en el núcleo ambiguo, en alguna división de éste o dependiendo de a qué músculo intrínseco laríngeo inervan.

Abreviaturas: NLR: nervio laríngeo recurrente; NLS: nervio laríngeo superior; HRP: peroxidasa de rábano picante; X supranodoso: ganglio supranodoso del nervio vago; X cervical: ganglio cervical del nervio vago; CT: músculo cricotiroideo; CAP: músculo cricoaritenosoide posterior; CAL: músculo cricoaritenosoide lateral; TA: músculo tiroaritenosoide; DY: diamino yellow; TB: true blue; WGA: aglutinina del germen de trigo; FL: formación laxa del núcleo ambiguo; FE: formación externa; NA: núcleo ambiguo.

Lawn (1966ab), en el conejo, describió la existencia de multipolares grandes, en la formación difusa del núcleo ambiguo, es decir, en la parte laringomotora del núcleo, aunque no detallo las dimensiones precisas de estas neuronas. (Tabla 1.1.4.1.7.).

AUTOR	TÉCNICA	FORMA	TAMAÑO(µm)
Lawn (1966ab)	Sección nerviosa de NLR, NLS, tronco del vago y glossofaríngeo (degeneración neuronas)	Multipolares Multipolares	Grandes Grandes y pequeña

Tabla 1.1.4.1.7. Único estudio realizado en el conejo sobre la morfología de las neuronas laríngeas. Se indican, el autor y año del estudio, la técnica empleada, así como la forma y el tamaño de las neuronas laríngeas encontradas en el núcleo ambiguo.

Abreviaturas: NLR: nervio laríngeo recurrente; NLS: nervio laríngeo superior.

AUTOR	ANIMAL	TÉCNICA	FORMA	TAMAÑO(μm)
Schweizer y cols. (1981)	Murciélago		NLS: Multipolares NLR: Multipolares	15 20
Basterra y cols. (1987)	Cobaya	HRP en músculos intrínsecos	Multipolares Algunas fusiformes	CT la + peq Resto:medio
Ranson y cols. (1995)	Visón Hurón	WGA-HRP en NLS y NLR		
Hopkins y cols. (1984)	Cerdo neonato	HRP en rama cervical del vago		Xd: 16.2x27.4

Tabla 1.1.4.1.8. Diversos estudios sobre la morfología de las neuronas laríngeas. Se indican, para cada estudio, los autores y años del estudio, el animal y la técnica empleados, así como la forma y el tamaño de las neuronas laríngeas encontradas en el núcleo ambiguo, en alguna división de éste, o en el núcleo dorsal del vago. En algún caso se diferencia las neuronas dependiendo de a qué músculo intrínseco inervan.

Abreviaturas: NLR: nervio laríngeo recurrente; NLS: nervio laríngeo superior; HRP: peroxidasa de rábano picante; X supranodoso: ganglio supranodoso del nervio vago; X cervical: ganglio cervical del nervio vago; DivDors: división dorsal del núcleo ambiguo; DivVent: división ventral; CT: músculo cricotiroideo; WGA: aglutinina del germen de trigo.

Otros tipos de animales menos comunes han sido utilizados para describir el tamaño o la forma de las neuronas del núcleo ambiguo. En la cobaya lo único que se ha descrito con respecto al tamaño de las neuronas del núcleo ambiguo es que las neuronas que inervan el músculo cricotiroideo son más pequeñas que el resto de las motoneuronas laríngeas, que el autor definió como de tamaño medio.

En todos los casos se describieron neuronas con morfología multipolar, y alguna fusiforme (Basterra y cols., 1987). Algo parecido ocurre en el murciélago, en el que se ha descrito que las neuronas vehiculizadas a través del nervio laríngeo superior, es decir, las que inervan el músculo cricotiroideo, son más pequeñas (15 μm de diámetro) que las neuronas cuyos axones transcurren a través del nervio laríngeo recurrente (20 μm de diámetro). La morfología de todas ellas era multipolar (Schweizer y cols., 1981) (Tabla 1.1.4.1.8.).

Sólo dos trabajos en la literatura consultada hacen mención a los cambios morfológicos que acontecen a nivel central como consecuencia de una lesión en los nervios laríngeos: en el primer trabajo se evaluaban los efectos de una lesión del nervio laríngeo recurrente en la población de motoneuronas del núcleo ambiguo que inervan el músculo cricoaritenideo posterior, en la cobaya, utilizando el trazador HRP (Nahm y cols., 1990). En los animales controles esta población de neuronas se situaba en el tercio medio del núcleo ambiguo, mientras que tras la reinervación esta población de motoneuronas era mucho menor en número, y se situaba extendida a lo largo de todo el núcleo ambiguo, sugiriendo que se había producido una reinervación no selectiva. En el segundo trabajo se evalúa la correlación de los cambios morfológicos que ocurren en la laringe (nervios y músculos) con el patrón de la organización de las neuronas laríngeas, como consecuencia de la sección del nervio laríngeo recurrente (Flint y cols., 1991). Así, los autores del trabajo estudiaron las motoneuronas marcadas en el núcleo ambiguo comparando los animales control con los animales con el nervio laríngeo recurrente lesionado, 15 semanas después de la lesión. Las conclusiones a las que llegan los autores es que la organización funcional de los distintos músculos laríngeos dentro del núcleo ambiguo se pierde, dado que, en los animales reinervados, las neuronas que inervan los músculos cricoaritenideo posterior, tiroaritenideo y cricoaritenideo lateral se localizan en la misma posición en la que se sitúan las neuronas que inervan los músculos tiroaritenideo y

cricoaritenideo lateral en los animales control. Por tanto, todas las neuronas que han reinervado se localizan en la posición que tenían las neuronas aductoras en los animales control. Los autores describían que estos cambios posicionales podían ocurrir por dos causas. En primer lugar, los cambios posicionales ocurrirían como consecuencia de una reinervación selectiva de las neuronas que inervan los músculos tiroaritenideo y cricoaritenideo lateral, y lo explican por una diferencia metabólica y/o enzimática entre las poblaciones abductoras y aductoras, que proporcionarían una mayor capacidad regenerativa a las motoneuronas que inervan los músculos tiroaritenideo y cricoaritenideo lateral. Por otro lado, una segunda explicación que los autores dieron a los cambios posicionales que ocurrían en el núcleo ambiguo reinervado es que hay una muerte celular de una población específica, en este caso la de las neuronas que inervan el músculo cricoaritenideo posterior. Esta explicación vendría apoyada por el hecho de que la población de neuronas que han reinervado, es menor en número que la población de neuronas del grupo control (Flint y cols., 1991).

En cuanto a la inmunohistoquímica del núcleo ambiguo, algunos autores han descrito a las neuronas del núcleo ambiguo conteniendo tanto acetilcolina (Ichikawa y Shimizu, 1998; Lee y cols. 1992) como péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Lee y cols. 1992). El CGRP se ha descrito contenido en las motoneuronas EVE, es decir, en la división dorsal del núcleo ambiguo, y debido a que hay una colocalización del CGRP con la acetilcolina, se ha sugerido que actúa como cotransmisor con la acetilcolina, de manera que posee un papel neuromodulador de la neurotransmisión en la unión neuromuscular de los músculos estriados del tracto alimentario (Lee y cols. 1992). También se ha descrito la presencia de butirilcolinesterasa en las motoneuronas esofágicas de la formación compacta y en las interneuronas de la formación semicompacta (Nance y cols., 1987), así como óxido nítrico sintasa en fibras y terminales de la formación compacta, y en algunos de sus cuerpos neuronales (Hopkins y cols., 1996).

1.1.4.2.- NUCLEOS DEL VAGO Y DEL TRACTO SOLITARIO

NUCLEO DORSAL DEL VAGO

El núcleo dorsal del vago es uno de los núcleos que constituyen el origen real de la raíz motora de nervio vago y del nervio glossofaríngeo. Este núcleo ocupa, en el suelo del cuarto ventrículo, una posición lateral al núcleo del hipogloso. Sus células son multipolares, con gran variedad de formas, aunque dominando la fusiforme y la triangular (Ramón y Cajal, 1909). En general la disposición de las células es irregular, sin diferenciarse en focos, con excepción del punto en el que el núcleo es mayor, donde aparecen dos zonas: una zona superficial laxa y otra profunda densa (Ramón y Cajal, 1909).

Kalia y Sullivan (1982), tras el trazado del ganglio inferior del nervio vago con HRP, describieron este núcleo como una columna de neuronas que se extiende desde 3 mm rostral al obex hasta segmentos espinales cervicales superiores, con una extensión de unos 3 mm, encontrando el mayor número de neuronas marcadas rostrales al obex.

En cuanto al número de neuronas del núcleo dorsal del vago, ha sido descrito, tras inyecciones de HRP en la rama cervical del nervio vago que en el núcleo contenía más de 1000 neuronas (Hopkins y cols., 1984). Sin embargo, con respecto a la representación laríngea en este núcleo, han sido descritas 188 neuronas, tras trazar con HRP el nervio laríngea superior de la rata (Hinrichsen y Ryan, 1981).

Algunos autores han descrito que el diámetro del soma de las neuronas de este núcleo es de un máximo de 20-25 μm en la rata y ratón (Ramón y Cajal, 1909), y de

16,2 μm de diámetro menor y 27,4 μm de diámetro mayor en el cerdo neonato (Hopkins y cols., 1984).

Las fibras de las neuronas del núcleo dorsal del vago atraviesan la médula oblongada en forma de pequeños haces de fibras que cursan ventrolateralmente a través de la formación reticular, para salir del tronco del encéfalo unidas a las fibras de las neuronas del núcleo ambiguo. Estas fibras salen por la parte ventral del bulbo raquídeo lateral, mientras que las fibras sensoriales vagas entran por la zona más dorsal (Kalia y Sullivan, 1982).

La primera mención a la relación de este núcleo con la laringe se realiza en 1905, con la descripción de que las fibras de las neuronas de este núcleo se dirigían a inervar a la laringe (Alfewsky, 1905). Este hecho ha sido corroborado posteriormente por otros autores que sostienen que el núcleo dorsal del vago es origen de fibras laríngeas EVG, es decir, fibras visceromotoras, que inervan las vísceras torácicas y abdominales, incluyendo la laringe (Kalia y Mesulam, 1980b).

Algunos autores describieron una representación topográfica de las vísceras abdominales y torácicas dentro del núcleo, de tal manera que los pulmones y bronquios estarían localizados rostralmente, a continuación se representan las vísceras abdominales y el corazón, y la representación más caudal sería la del esófago (Getz y Sirnes, 1949). Por otro lado, otros autores describieron que estaba organizado en columnas longitudinales, que se correspondían con las ramas subdiafragmáticas del nervio vago, de tal manera que la representación de las distintas vísceras seguiría una distribución somatotópica lateromedial, y no rostrocaudal (Powley y cols., 1992).

NUCLEO DEL TRACTO SOLITARIO

El tracto solitario y el núcleo del tracto solitario son los territorios de origen de las fibras aferentes laríngeas (Kalia y Mesulam, 1980ab; Hamilton y Norgren, 1984).

El núcleo del tracto solitario aparece 4 mm caudal al obex, y se extiende rostralmente hasta la altura del polo caudal del núcleo motor facial, a una distancia de 8 mm. El polo dorsal del núcleo del tracto solitario se localiza dorsal y lateralmente al núcleo dorsal del vago, a 2-2,3 mm rostral al obex (Hamilton y Norgren, 1984).

Tras inyección de HRP en el ganglio inferior, lo que expone elementos sensoriales y motores del nervio vago, en la rata, se ha encontrado que el núcleo del tracto solitario puede ser dividido en varios subnúcleos. Estos subnúcleos están determinados por la diferente citoarquitectura de las neuronas, que queda revelada por el método de tinción de Nissl, así como por los patrones de conectividad de las neuronas (Kalia y Sullivan 1982; Hamilton y Norgren, 1984).

Algunos subnúcleos del núcleo del tracto solitario tienen grandes proyecciones hacia las formaciones semicompacta y laxa del núcleo ambiguo (Hamilton y Norgren, 1984; Saxon y cols. 1996).

1.1.5.- FISIOLOGÍA

1.1.5.1.- FUNCIONES DE LA LARINGE

El papel original de la laringe es proteger la vía aérea. En la escala filogenética, la laringe aparece como un esfínter para evitar la entrada de cualquier elemento extraño en la vía aérea, posteriormente, si avanzamos en esta escala, observamos cómo se desarrollaron los músculos dilatadores para permitir la apertura activa de la laringe. En animales más evolucionados, la laringe no es sólo una válvula de apertura o cierre sino una válvula de resistencia variable capaz de regular el flujo aéreo (Leon X, 2008).

Así pues, las funciones de las laringe las podemos dividir en:

- Esfinteriana.
- Respiratoria
- Fonatoria.

1.1.5.1.1.- ESFINTERIANA

Según el estudio filogenético visto previamente, el papel funcional que representa la laringe, se puede esquematizar en tres funciones, esfínter protector de la vía respiratoria, válvula de paso del flujo aéreo y como órgano emisor de sonido. Las dos primeras actuaciones son de aparición más antigua en la escala evolutiva y análogas en todas las especies superiores, sin embargo, la última adquiere en el hombre un perfeccionamiento único (Zemlin, 1998). Todas estas funciones se realizan, siempre bajo control central, gracias a una precisa y compleja coordinación espacio-temporal de toda una serie de acontecimientos neuromusculares periféricos. Estos acontecimientos son los responsables del cierre o de la apertura de los pliegues vocales de la laringe, acciones que se realizan en función de las necesidades funcionales del momento (Wyke y Kirchner, 1976). Por otro lado, la misma función esfinteriana es a su vez utilizada como elemento estabilizador de la cintura escapular y de la caja torácica (Fink y Demarest, 1978). De esta manera se favorecen aquellas actividades que requieren grandes presiones abdominales, como el levantamiento de pesos por parte de las extremidades superiores o actividades tales como la defecación, la micción o incluso el parto (Zemlin, 1998). Dentro de esta función esfinteriana se pueden englobar los reflejos laríngeos.

REFLEJO TUSIGENO

Es un reflejo de protección en el que está implicada la laringe. La tos juega un papel muy importante en la limpieza del árbol traqueobronquial y en el mantenimiento de la permeabilidad de la vía aérea. De hecho, la alteración del reflejo tusígeno puede acarrear serios problemas clínicos. La tos puede ser un acto voluntario o una respuesta

refleja a la estimulación de la laringe o de los receptores traqueobronquiales (Zemlin, 1998). El reflejo tusígeno se reduce durante el sueño, de modo que se necesita un estímulo mayor cuanto más profundo sea éste.

Una respuesta de adducción y tos puede ser originada por estímulos procedentes de diversas zonas extralaringeas, entre estas, la mucosa faríngea, la mucosa nasal, la membrana timpánica o el conducto auditivo externo y serán transmitidos por las fibras sensitivas aferentes de los nervios craneales correspondientes a esa región (Suzuki y Sasaki, 1977 a). Pero el reflejo de esfínter protector es estimulado principalmente por los receptores de la mucosa laríngea y está mediado por un arco polisináptico cuya vía aferente llega a troncoencéfalo, desde donde parten las fibras eferentes que finalmente acaban en los músculos laríngeos aductores (Sasaki y Suzuki 1976; Kirchner, 1987).

Así, los receptores de la mucosa supraglótica y glótica son excitados mediante estímulos de tipo táctil, químico o térmico; mientras que los receptores localizados en subglotis son estimulados por los aumentos de presión aérea. Los nervios laríngeos superiores vehiculizan estos impulsos procedentes de la región supraglótica y las ramas sensitivas de los nervios laríngeos inferiores transmiten los originados en glotis y subglotis. Los cuerpos neuronales sensitivos asientan en los ganglios nodosos y sus axones llegan al núcleo del tracto solitario, donde residen las segundas neuronas sensitivas. Los axones de estas segundas neuronas parten hacia el núcleo ambiguo, desde donde, por vía vagal, se desencadena una respuesta motora de cierre involuntario de laringe. (Tucker, 1993; Kirchner, 1994).

REFLEJO DE CIERRE LARINGEO

En individuos sanos, la estimulación bilateral de los nervios laríngeos superiores produce un reflejo protector que se lleva a cabo a tres niveles, en los tres planos horizontales de cierre laríngeo (Sasaki e Isaacson, 1988):

1. El primero está constituido por los repliegues ariepiglóticos, que contienen la porción más superior del músculo tiroaritenosoide y cuya contracción ocluye la entrada a laringe. El tercio anterior del vestíbulo laríngeo es cerrado por el cartílago epiglótico y el posterior por los aritenosides en rotación interna.

2. El segundo plano protector se produce por contracción de las bandas ventriculares, que forman el techo del ventrículo de Morgagni. A ambos lados de estas falsas cuerdas se encuentran las fibras tiroaritenosideas laterales, que provocan la adducción también de los repliegues vocales.

3. El tercer nivel de cierre se ejecuta mediante el contacto entre los repliegues vocales, con lo que se consiguen dos efectos: por un lado, la adhesión de sus bordes, ligeramente elevados, lo que proporciona una válvula pasiva; mientras que con las fibras del músculo tiroaritenosoide inferior se aporta la fuerza necesaria para el cierre subglótico.

Este mecanismo valvular a nivel de los pliegues vocales se pone en marcha para impedir la entrada de agentes desde el exterior, por lo que representa el más importante mecanismo protector contra la aspiración. Asimismo, también se emplea para inmovilizar la caja torácica y mejorar la eficacia de la musculatura pectoral, con lo que se favorecen los ejercicios de braquiación, como en la escalada. Pero por sí solo este cierre no es suficiente para soportar grandes presiones subglóticas, como las

producidas en maniobras de esfuerzo abdominal (Ciges y cols., 1998). Mediante la contracción brusca de las bandas ventriculares se consigue un aumento de la presión intratorácica, empleado para expectorar o toser (Kirchner, 1994).

Durante la deglución, la vía aérea es protegida mediante el reflejo de cierre laríngeo, en el que participan los tres niveles de protección laríngea. Simultáneamente, la musculatura supra e infrahioidea eleva la laringe y los constrictores faríngeos aumentan la presión intrafaríngea (Kirchner, 1994). Toda la secuenciación deglutoria es regulada por la sustancia reticular troncoencefálica (Leonard y Kendall, 1997).

El laringoespasma puede ser considerado una exageración fisiológica del reflejo de cierre como respuesta a una intensa y mantenida estimulación glótica y/o supraglótica, la cual acaba produciendo una adducción de tipo tónico que se prolonga después de haber desaparecido el estímulo (Sasaki e Isaacson, 1988; Suzuki y Sasaki, 1977 b; Tucker, 1993).

La contracción mantenida de los tres niveles laríngeos incrementa simultáneamente la presión intratorácica e intraabdominal, que sirve de apoyo para realizar esfuerzos físicos violentos como la defecación, micción, el parto o el levantamiento de pesos (Cabezudo, 1988).

1.1.5.1.2.- RESPIRATORIA

Los músculos intrínsecos de la laringe durante la respiración tienen una actividad fásica, específica para cada músculo y que puede ser solo inspiratoria, solo espiratoria, o ambas. En relación con este hecho muscular neuronas del núcleo ambiguo tienen una actividad rítmica relacionada con el ritmo respiratorio. Otros músculos tienen una actividad continua ya que su función es mantener fijos los cartílagos laríngeos (Jordan 2001).

La inspiración normal, en calma, es un proceso activo, donde, a nivel laríngeo, hay una relajación de los músculos constrictores y una contracción o tensión de los dilatadores y especialmente del crico-aritenoideo posterior, máximo responsable de la dilatación glótica, evidenciando una apertura inspiratoria de la glotis (Chanaud y Ludlow, 1992). La traquea es ascendida y los tejidos blandos de la laringe se tensan, los pliegues vestibulares y aritenoepiglóticos se alargan, la fosa preepiglótica aumenta de diámetro vertical y se retrae transversalmente. La distancia entre el cricotiroideo y el hioides se acorta y se produce una dilatación del espacio glótico necesaria para la ventilación (Morris, 1988).

En la inspiración forzada se necesita una contracción de los músculos dilatadores más potente y los pliegues vocales se repliegan hacia arriba de tal forma que se juntan con los ventrículos laríngeos, los estudios electromiográficos demuestran una clara abducción laríngea y una disminución de la actividad de los músculos aductores, (Kuna y Vanoye, 1994).

La abducción inspiratoria es mayor a medida que aumentan las necesidades de ventilación, por lo que se produce una mayor apertura glótica en la hiperventilación, mientras que se va reduciendo la hendidura glótica a medida que mejora la oxigenación arterial y disminuye la profundidad de la inspiración (Sasaki y cols, 1973; Kirchner, 1994).

Durante la espiración hay una relajación de los dilatadores y correlativamente una discreta tensión de los pliegues vocales. En este momento, las fuerzas elásticas que han sido generadas por la distensión de la caja torácica y del tejido pulmonar, hacen que se retorne al volumen de reposo, de modo que al final de la fase espiratoria, sólo queda el volumen de aire residual (Proctor, 1980).

Así en la espiración forzada, a nivel laríngeo intervienen tanto la musculatura abductora de glotis (cricoaritenoideos posteriores), como los músculos aductores (cricotiroideos, tiroaritenoideos e interaritenoideos) y de esta forma se logra que durante la espiración máxima se produzca una apertura glótica similar a la conseguida durante la inspiración tranquila (Kuna y Vanoye, 1994). Sobre todo los tiroaritenoideos y los cricotiroideos poseen una compleja distribución de unidades motoras (rápidas y lentas) que se pueden activar según diversos patrones de contracción (fásica y tónica), y de forma diferenciada en cada fase del ciclo respiratorio, lo que permite una gran versatilidad de respuestas y un control muy preciso (Sasaki, 1988). La actuación conjunta de todos estos músculos, cricotiroideos por un lado y tiroaritenoideos e interaritenoideos por otro, parece ser la responsable de la estabilidad en la posición de apertura glótica durante la espiración (Chanaud y Ludlow, 1992).

Con respecto a la participación de los músculos laríngeos en la actividad respiratoria:

- Músculo cricotiroideo. Durante la entrada del aire, tensan y elongan los repliegues vocales, incrementando de este modo el diámetro antero-posterior de la glotis y disminuyendo la resistencia glótica a la inspiración (Suzuki y cols,1970). Durante la espiración se evidencia una actividad contráctil que aumenta el espacio glótico al elongarlo (Chanaud y Ludlow, 1992).
- Músculo tiroaritenoides. la contracción simultánea con sus músculos antagonistas (cricotiroideos) contribuya a la estabilidad del espacio glótico, proporcionando la suficiente rigidez como para evitar la succión de los repliegues vocales durante la inspiración (Crago y cols., 1986). Durante la espiración parece cerrar parcialmente la glotis (Kuna y Vanoye, 1994).
- Músculo cricoaritenoides posterior. Su acción produce una apertura glótica (Negus, 1949) antes de que se inicie la actividad eléctrica en el nervio frénico (Bianconi y Raschi, 1964).

1.1.5.1.3.- FONATORIA

Dentro del contexto de la fonación y de la producción vocal, la laringe, empleando su primigenia función esfinteriana, proporciona un estrechamiento que origina la ondulación de la mucosa de los repliegues vocales al pasar el aire desde los pulmones. Se origina así un sonido laríngeo o espectro tonal, constituido por un conjunto de vibraciones en las que se distingue una frecuencia fundamental de la voz (Bermudez de Alvear, 2000).

El proceso de la producción de sonido se genera por medio de un ciclo de los pliegues vocales. Cuanto más rápido se repita el ciclo más alto será el tono vocal y cuanto más lento, el sonido será más grave, es decir, que el sonido laríngeo así provocado depende de la rítmica interrupción de la columna aérea ascendente que atraviesa la glotis. Fisiológicamente, podemos describir que estos cambios de tono vocal se deben a variaciones de masa, longitud y tensión que realizan los pliegues vocales. Así, un aumento de la masa hace que los pliegues vibren más lentamente y su resultado es un tono grave, mientras que una disminución de la masa da tonos más agudos. Estos últimos se relacionan con una mayor longitud y tensión de las cuerdas vocales, mientras que los tonos graves lo hacen con un acortamiento de las mismas (Segre, 1997).

Desde el punto de vista histórico, la función de la laringe en la emisión del sonido ha pasado desde la teoría aerodinámico-elástica de Van der Berg (1958), y la posterior teoría mucoondulatoria de Perelló (1967), que vino a completar a la anterior, fusionándose ambas en la teoría aerodinámico-muco-ondulatoria de la emisión de voz. El concepto de oscilador laríngeo se desarrolló posteriormente gracias al modelo

cubierta-cuerpo elaborado por Hirano (1975) sobre la base de las propiedades biomecánicas del repliegue vocal; posteriormente este autor definió su ultraestructura como compuesta básicamente por estratos que desde fuera hacia dentro van presentando un coeficiente de rigidez progresivamente superior (Hirano y Kakita, 1985). Más tarde la teoría óscilo-impedancial de Dejonckere (1981) así como los modelos matemáticos empleados por Titze para estudiar los fenómenos lineales (de ondulación periódica) y los fenómenos no lineales (caóticos) generados en los repliegues vocales por acción del flujo aéreo transglótico (Titze, 1993), con las aportaciones al conocimiento de la fuente glótica de Gunnar Fant y Johann Liljencrants (1985) constituyen las innovaciones más definitivas y recientes sobre las que actualmente se desarrolla la investigación de la emisión vocal.

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de la somatotopía de la musculatura laríngea es básico para poder abordar de manera acorde con el método científico los problemas que plantea la reinervación laríngea, tanto los referidos a las parálisis laríngeas como los derivados de la imposibilidad actual de realizar trasplantes laríngeos funcionales. La literatura nos revela algunos estudios referidos a la identificación central de las neuronas motoras de los nervios laríngeos superior e inferior, o referidos a la somatotopía de esas motoneuronas trazadas desde la musculatura intrínseca laríngea. Estos estudios se han realizado en diversos animales de experimentación y muestran, tanto interespecífica como intraespecíficamente, variaciones en el patrón somatotópico de las neuronas motoras de la musculatura intrínseca de la laringe. La ausencia, por tanto, de un modelo animal para el estudio de la inervación laríngea suficientemente consolidado, así como la existencia de numerosas discrepancias e incoherencias en los datos presentados en la literatura que hemos consultado, nos han llevado a intentar desarrollar un modelo en el animal de laboratorio por excelencia, la rata de la cepa Sprague-Dawley (*Rattus norvegicus*), y a realizar un estudio sistemático de la somatotopía de la musculatura intrínseca de la laringe que pueda aclarar las dudas que, hoy por hoy, persisten en este ámbito.

HIPÓTESIS

Las motoneuronas que inervan la musculatura intrínseca laríngea se distribuyen en el núcleo ambiguo según una columna rostrocaudal, con la presencia de agrupaciones neuronales para cada uno de los músculos intrínsecos de la laringe. Estas agrupaciones de neuronas tienen una localización específica y constante dentro de la columna rostrocaudal del núcleo ambiguo, pudiendo así establecerse una relación entre la posición de las motoneuronas en el núcleo ambiguo y el músculo intrínseco laríngeo al que corresponden.

OBJETIVOS

Por todo lo expuesto hasta ahora, nos planteamos el desarrollo de la presente tesis con los siguientes objetivos:

1. Identificar la posición en el núcleo ambiguo de las motoneuronas que inervan los músculos intrínsecos laríngeos cricotiroideo, cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides.
2. Obtener el mapa somatotópico del núcleo ambiguo para las motoneuronas que inervan los músculos intrínsecos laríngeos cricotiroideo, cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides.
3. Cuantificar el número promedio de neuronas que inervan los músculos intrínsecos laríngeos cricotiroideo, cricoaritenoides posterior y tiroaritenoides.
4. Establecer un modelo de inervación laríngea normal en la rata que sirva para el desarrollo de estudios experimentales sobre los procesos de lesión y

degeneración de los nervios laríngeos y reinervación de la musculatura intrínseca laríngea.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- MODELO ANIMAL

Como modelo de animal en este estudio se utilizó la rata albina (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague Dawley, empleándose siempre en el inicio de los experimentos machos jóvenes con un peso sobre los 250 g. Esta selección coincide con la realizada por otros grupos de investigación en sus estudios sobre el núcleo ambiguo y la inervación de la laringe (Travers y Norgren, 1983; Furusawa y cols., 1996; Berkowitz y cols., 1999; Hayakawa y cols., 1999).

Se han escogido animales machos debido a que, a diferencia de las hembras, los primeros no pasan por diversos ciclos hormonales que podrían afectar su comportamiento. El empleo de este modelo de experimentación animal está muy extendido en la investigación biomédica, y las principales ventajas que se encuentran en su empleo son:

1. La sencillez en su manipulación.
2. El bajo coste de adquisición y mantenimiento.
3. Una excelente resistencia a las enfermedades.
4. La posibilidad de obtener resultados en un plazo de tiempo aceptable.
5. Los resultados alcanzados con los protocolos experimentales permiten un adecuado análisis y una alta reproductibilidad.

Se emplearon un total de 26 ratas con un peso comprendido entre los 250 y los 300 g. La edad estaba comprendida se encontraba entre los 3 y los 4 meses porque nuestra serie experimental está basado en un modelo de adulto joven al igual que otros

trabajos similares (Yajima y Hayashi, 1983, Bieger y Hopkins, 1987; Nuñez-Abades, 1992; Berkowitz y cols., 1999; Hayakawa y cols., 1999).

Los animales permanecieron estabulados en el animalario de la Facultad de Medicina en la Universidad Complutense de Madrid dentro de un ambiente higiénico, en ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, y condiciones estables de temperatura (25°C) y humedad. Los animales tenían libre acceso tanto al pienso como al agua.

El diseño experimental completo de este estudio se ha realizado acorde con la normativa vigente en la Unión Europea (86/609/EEC) y España (RD 223/1998), y ha sido evaluado y aprobado por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.

3.1.1.- ANATOMIA DE LA LARINGE DE LA RATA

Previamente a los siguientes epígrafes, es preciso realizar una descripción de la anatomía de la laringe de la rata Sprague-Dawley para una mejor comprensión de los protocolos experimentales y de la utilidad de este animal para el estudio de las proyecciones nerviosas centrales sobre la musculatura laríngea.

ESQUELETO DE LA LARINGE

El esqueleto de la laringe de la rata es cartilaginoso y se compone de un cartílago tiroideos, un cartílago cricoides y dos cartílagos aritenoides (Fig. 3.1.1.1 y 3.1.1.2). Además se puede observar, en la mitad anterior de los pliegues vocales, cerca de la base de la epiglotis, un cartílago adicional con forma de ala delta, el cartílago alar, que se conecta a la base de la epiglotis mediante tejido conectivo fibroso y que sirve de anclaje a la musculatura endolaríngea (Inagi y cols., 1998).

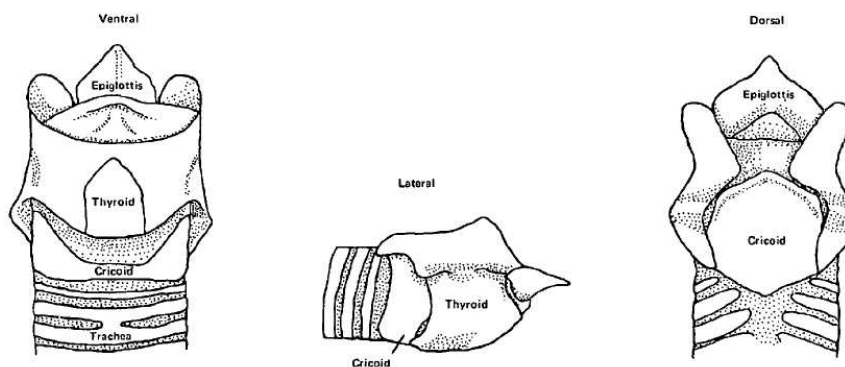


Figura 3.1.1.1 Esqueleto laríngeo de la rata (Tomado de G. Smith (Smith, 1977))

MUSCULATURA LARINGEA

Los músculos tiroaritenoso, cricotiroideo y cricoaritenoso posterior, objeto del presente estudio, se localizan básicamente como en la laringe humana. El

tiroaritenoso está constituido por dos anchas bandas musculares que se extienden desde la superficie interna del cartílago tiroideo y parte del cono elástico, hasta la superficie anterior y apófisis vocal de cada cartílago aritenoso, el cricotiroideo está innervado por la rama externa del nervio laríngeo superior y su función, consistente en aproximar entre sí al tiroideo y al cricoideo, haciendo bascular al primero hacia delante, el estiramiento que produce en los pliegues vocales consigue aumentar su tensión y reforzar la acción del músculo tiroaritenoso y el cricoaritenoso posterior se extiende desde la parte posterior de la lámina cricoidea hasta la superficie posterior de la apófisis muscular aritenosa, es el único músculo abductor de los repliegues vocales, sirve para abrir la glotis al imprimir un movimiento de rotación de los aritenoides (Ford y Bless, 1991; Tucker, 1993).

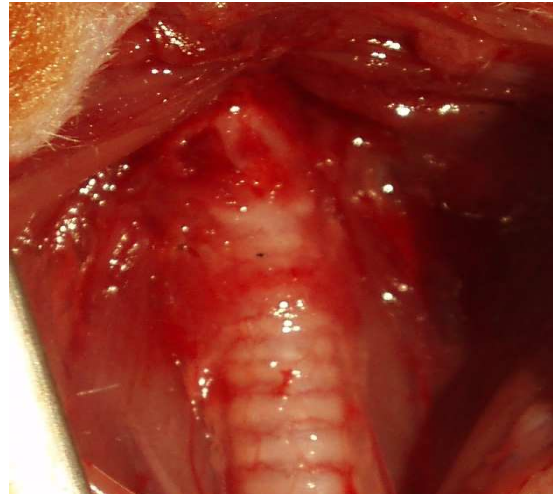


Figura 3.1.1.2. Visión anterior de la laringe de la rata.

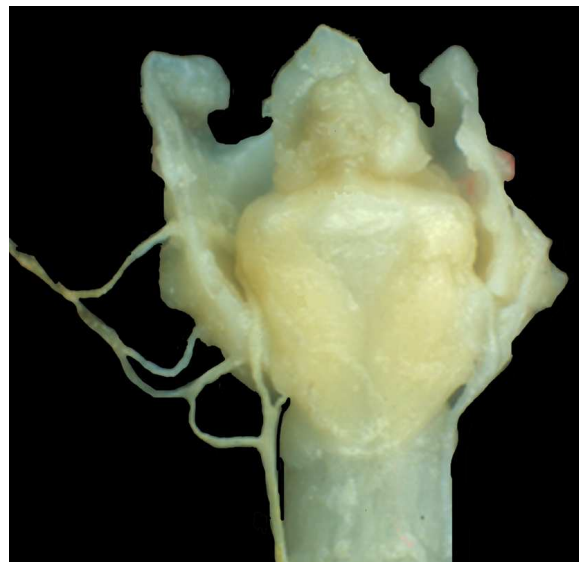


Figura 3.1.1.3 Nervios laríngeos en la rata, superior e inferior (Maranillo E)

Además están descritos otros dos músculos que no aparecen en el humano. El músculo cricotiroideo alar, que discurre desde el cartílago alar hasta el proceso muscular del cartílago aritenoides y el músculo cricoaritenoides superior que se extiende desde el cartílago aritenoides hasta el tubérculo medial del cartílago cricoides (Inagi y cols., 1998).

FUNCIONES MUSCULARES

Basándose en el origen y la inserción de los músculos intrínsecos laríngeos en el esqueleto cartilaginoso, así como en la dirección de las fibras musculares, las funciones de los grupos musculares de la laringe de la rata parecen ser equivalentes a las de la laringe humana. Así el músculo cricoaritenoides superior parece ser el equivalente en la laringe de la rata a los músculos aritenoides transverso y oblicuo de la laringe humana y, por otra parte, el músculo cricotiroideo alar parece es capaz de cerrar la laringe gracias a la movilización que realiza del cartílago epiglótico, como lo realiza en la laringe humana la porción ariepiglótica del músculo aritenoides oblicuo (Inagi y cols., 1998).

3.2.- DISEÑO EXPERIMENTAL

Para estudiar la distribución en el tronco del encéfalo de las motoneuronas que inervan la musculatura intrínseca laríngea, se establecieron 5 grupos en los que se intervinieron tres músculos: cricotiroideo, cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo. La elección de estos músculos se debió, por un lado, al hecho de disponer de músculos inervados por los dos nervios laríngeos, el superior (cricotiroideo) y el inferior (tiroaritenideo y cricoaritenideo posterior) y, por otra parte, por tratarse de unas estructuras fácilmente accesibles, identificables y susceptibles de ser inyectadas con el trazador con baja probabilidad de contaminar otras estructuras vecinas. Tres grupos analizaron cada uno de los músculos por separado: 11 animales para el músculo cricotiroideo, 5 para el cricoaritenideo posterior y 3 para el tiroaritenideo. Por otra parte, se emplearon 7 ratas para la combinación de dos músculos en el mismo animal: 2 para el tiroaritenideo y el cricotiroideo y 5 más para el tiroaritenideo y el cricoaritenideo posterior. En ningún animal se realizó la combinación del cricoaritenideo posterior y el cricotiroideo. En la tabla 3.2.1 aparecen resumidos los grupos experimentales empleados.

	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV		GRUPO V	
	CT	CAP	TA	CT/TA		CAP/TA	
				CT	TA	CAP	TA
AF 488	8	4	3	1	1	4	1
AF 594	3	1	0	1	1	1	4
TOTAL	11	5	3	2		5	

Tabla 3.2.1. Grupos experimentales diseñados para los ensayos de trazado de músculos.

CT. Músculo cricotiroideo.

CAP. Músculo cricoaritenideo posterior.

TA. Músculo tiroaritenideo.

AF488. Toxina colérica conjugada a Alexa Fluor 488

AF594. Toxina colérica conjugada a Alexa Fluor 594

3.2.1- TRAZADOR NEURONAL: LA SUBUNIDAD β DE LA TOXINA COLÉRICA

Se ha usado la subunidad β de la toxina colérica (CT β) como trazador de las motoneuronas que inervan la musculatura intrínseca de la laringe por tratarse este de un trazador retrógrado. Esta característica permite que los cuerpos neuronales puedan rellenarse con la sustancia aplicando la misma en el cabo periférico de la motoneurona es decir, desde el botón terminal de su axón, gracias al transporte axonal retrógrado de la misma; es este modo de transporte quien da el nombre genérico a este tipo de trazadores.

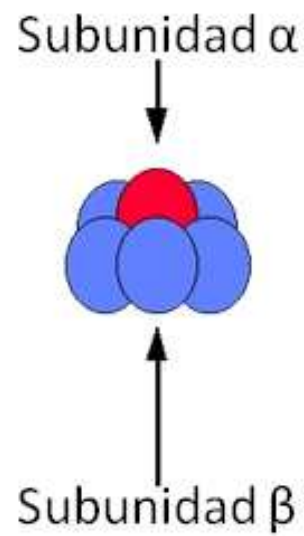


Figura 3.2.1.1. Modelo de la molécula de la toxina colérica

La toxina colérica es una proteína oligomérica, responsable de la enfermedad del cólera, que es expresada por las bacterias de la especie *Vibrio cholerae* (Conte y cols., 2009). La toxina está constituida en dos subunidades CT α , catalíticas, y cinco subunidades CT β , que permiten la unión a los gangliósidos de la membrana plasmática de las células epiteliales (Mekalanos y cols., 1983) (Fig. 3.2.1.1). La subunidad β aislada es un eficiente trazador retrógrado, si bien se ha demostrado que también funciona como trazador anterógrado (Conte y cols., 2009). Puede ser utilizado mediante iontoforesis o inyección directa (Conte y cols., 2009). Resulta por todo ello, muy adecuado para la identificación de las poblaciones de neuronas que inervan los músculos intrínsecos laríngeos. Una ventaja de la utilización como retrotrazador es su versatilidad, pudiendo emplearse conjugado con HRP o bien con biotina, conjugados ambos que, mediante las técnicas adecuadas de visualización de la reacción, permiten observar las neuronas trazadas en microscopía óptica de campo claro (Sakai y cols., 2009). Para técnicas de microscopía de fluorescencia, el trazador debe ser identificado mediante moléculas que emiten a diferentes longitudes de onda, por lo tanto

visualizables con distintos colores lo que facilita la identificación a la vez de dos trazados distintos. Entre estas moléculas destaca la estreptavidina conjugada a distintas moléculas fluorescentes, y que implica en su uso un proceso de revelado, o el empleo de toxina colérica directamente conjugada a fluoróforos como la fluoresceína-5-isotiocianato (FITC), la tetrametil rodamina isotiocianato (TRICT), o una amplia gama de moléculas denominadas comercialmente Alexa Fluor (Conte y cols., 2009), que permiten, sin ningún proceso adicional, visualizar las células fluorescentes directamente.

En nuestros experimentos comenzamos empleando CT β conjugada a Alexa Fluor 488, que emite luz verde en el microscopio de fluorescencia, y CT β conjugada a biotina la cual, mediante un revelado con estreptavidina conjugada a Texas Red, finalmente en el microscopio debía de identificar en rojo las neuronas trazadas. Después de varios ensayos insatisfactorios con este último protocolo, decidimos emplear CT β conjugada a Alexa Fluor 594, que también emite en el espectro rojo.

Para la preparación para la inyección intramuscular durante la cirugía, el trazador se diluía al 1% con tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4) y se alicuotaba en volúmenes de 1 μ l en tubos Eppendorf adecuados, conservados a -20°C hasta su utilización. En cada músculo objeto de estudio, se inyectaba 1 μ l de toxina colérica mediante una jeringa Hamilton de 10 μ l acoplada a una aguja de vidrio capilar. El sistema jeringa-aguja estaba relleno con glicerina, para favorecer la salida de la solución de trazador de la punta de la aguja hacia el músculo. Una vez inyectado el trazador, se dejaba permanecer la punta de vidrio en el músculo durante un tiempo no inferior a dos minutos, para permitir la adecuada difusión del trazador dentro del vientre muscular e impedir que difundiera al exterior del mismo. Adicionalmente, se puso particular cuidado en limpiar cualquier cantidad de trazador que pudiera fluir al retirar la aguja después de cada inyección,

para evitar la difusión del mismo y, por tanto, un posible trazado accidental de otras estructuras que, como los músculos faríngeos, la musculatura esofágica o el resto de la musculatura laríngea, todos con representación neuronal en el núcleo ambiguo, pudieran dar lugar a resultados artefactuales y por ende a interpretaciones erróneas de esos resultados.

3.2.2- TÉCNICA QUIRÚRGICA E INYECCIÓN DEL TRAZADOR

Todas las intervenciones han sido llevadas a cabo, en condiciones asépticas, con un microscopio quirúrgico (Leica), utilizando aumentos desde 10x a 40x, debido al pequeño tamaño del campo operatorio y de las estructuras a manipular. Además, durante todo el proceso quirúrgico la temperatura corporal de los animales fue regulada y controlada, usando para ello un termómetro rectal y una manta eléctrica regulable en temperatura, que mantenían la temperatura de los animales en unos 37°C.

Cada animal fue anestesiado mediante inyección intraperitoneal con ketamina (92 mg/kg) en combinación con xilacina (8 mg/kg). Como analgesia, se empleó buprenorfina (0,02-0,1 mg/Kg) más meloxicam (1-2 mg/Kg) intraperitoneal cada 8 horas durante dos días. Posteriormente, hasta el día del sacrificio, se administró ibuprofeno por vía oral.

Tras rasurar y aplicar povidona yodada en la piel de la cara anterior del cuello, se procedía a efectuar una incisión longitudinal en la línea media del cuello (Fig. 3.2.2.1). La piel, glándulas salivares (Fig. 3.2.2.2) y musculatura hioidea fueron apartadas lateralmente (Fig. 3.2.2.3), con ayuda de un separador, para dejar una ventana donde se encontraba expuesta la laringe, la tráquea y la glándula tiroides.

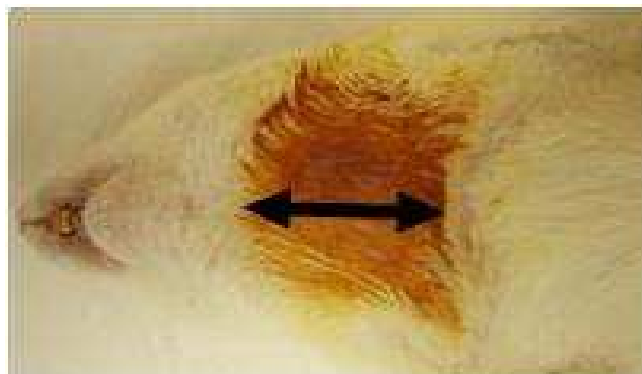


Figura 3.2.2.1. Incisión cervical

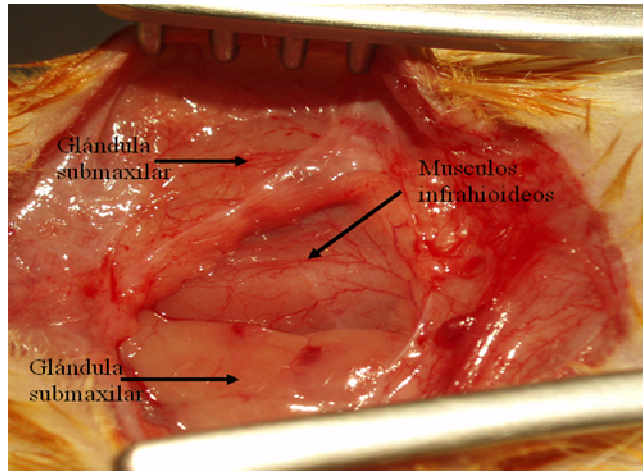


Figura 3.2.2.2. Separación de las glándulas salivares y exposición de la musculatura infrahioidea

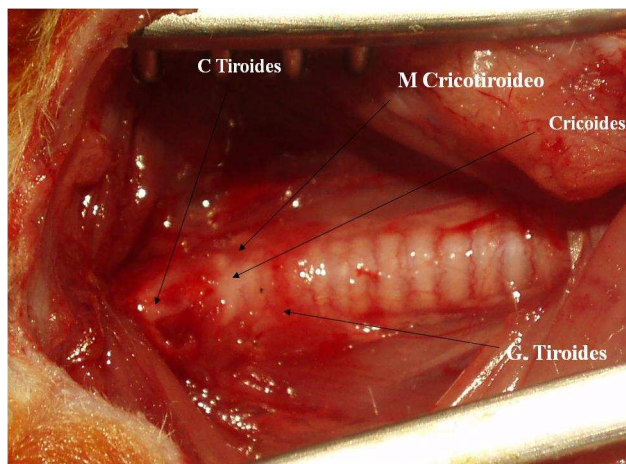


Figura 3.2.2.3. Exposición de la laringe

El músculo cricotiroideo es visible, con la lupa quirúrgica, una vez retirada la musculatura infrahioidea (Fig. 3.2.2.3), por lo que la inyección de toxina colérica es la más sencilla de ejecutar ya que basta con atravesar la fascia que lo envuelve e inyectar el trazador directamente en el músculo.

La inyección del músculo tiroaritenideo se realizaba abriendo una pequeña ventana en el cartílago tiroides mediante unas tijeras oftalmológicas (Fig. 3.2.2.4). En

el proceso se cauterizaban ramas musculares de la arteria tiroidea para evitar la rotura de estos vasos y que en el sangrado subsiguiente provocase la difusión de la toxina colérica. En la inyección de este músculo se evitaba cuidadosamente la difusión del trazador hacia el músculo cricoaritenideo lateral aplicando muy lentamente el trazador y retirando el exceso con un bastoncillo.

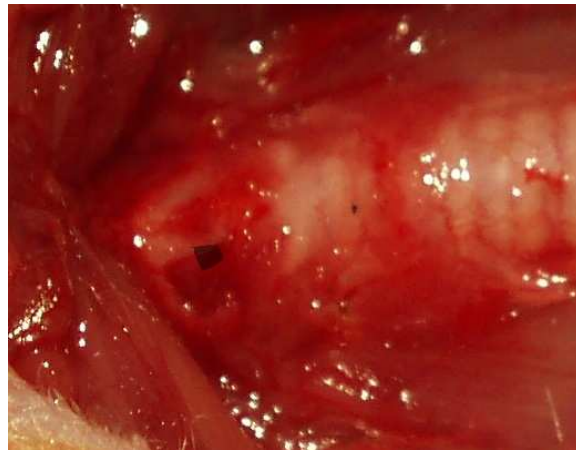


Figura 3.2.2.4 Ventana Tiroidea

Por último, la inyección del músculo cricoaritenideo posterior resulta muy complicada por la posición del mismo, oculto en la superficie dorsal de la laringe, lo que hacía imposible abordarlo directamente desde la ventana abierta en la intervención. Por ello, para acceder a este músculo, se procedía rotando la laringe (Fig. 3.2.2.5) tras disecar el músculo constrictor de la faringe y las fibras del músculo cricofaríngeo, que mantienen a la laringe en su posición, poniendo especial atención en evitar la rotura de la arteria tiroidea superior. Todo este proceso exigía poner especial cuidado para evitar la contaminación de trazador, por lo que requería aislar la laringe de otras estructuras por medio de una lámina de parafilm. En algún caso no se realizó la interposición del parafilm y en los resultados se observaron neuronas trazadas aleatoriamente en otras regiones de la médula oblongada, además de las esperables en el núcleo ambiguo.

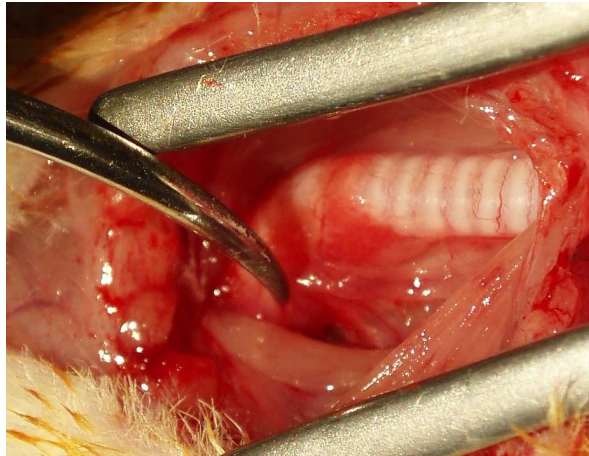


Figura 3.2.2.5 Rotación de la laringe

Una vez finalizadas las inyecciones, se cerraban los planos musculares y, tras suturar la piel, la región se desinfectaba nuevamente con povidona yodada. Una vez recuperados del efecto de la anestesia, que duraba unos 30 minutos, los animales se depositaban nuevamente en su jaula del estabulario, dónde se les administraba el tratamiento analgésico post-quirúrgico y eran observados para comprobar que su recuperación continuaba adecuadamente.

3.2.3- PROCESAMIENTO DEL TRONCO DEL ENCÉFALO

Los animales eran mantenidos en un periodo de supervivencia postoperatorio de tres días, suficiente para el transporte de la CT β desde la unión neuromuscular hasta el cuerpo neuronal, en las mismas condiciones de su estabulación habitual. Pasado este periodo, eran sacrificados mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a una dosis letal (12 mg/kg). Una vez que todos los reflejos eran abolidos por el efecto del barbitúrico, mediante una toracotomía se accedía al corazón y, a través del ventrículo izquierdo, se introducía en la aorta una cánula acoplada a una bomba peristáltica. Se procedía entonces a perfundir unos 200ml de solución salina (0,9% NaCl; 4°C) y, sin solución de continuidad, unos 300 ml de una solución al 4% de paraformaldehído en tampón fosfato (0,1 M; pH 7,4; 4°C). Durante todo el periodo de perfusión se cuidaba de que no pasasen burbujas de aire al sistema vascular, lo que generaría una embolia que afectaría a la correcta fijación de los tejidos. Finalizada la perfusión, el tronco del encéfalo junto con la médula espinal más rostral eran disecados del cráneo y la columna cervical y, durante una hora, posfijados en la solución de paraformaldehído. A continuación, y para preservarlos de la formación de cristales de hielo durante la congelación, los troncos del encéfalo eran sucesivamente inmersos en soluciones de tampón fosfato, primero con 15% de sacarosa (unas 24 horas), y, después, con 30% de sacarosa (hasta que se hundían). Por otra parte, y para comprobar si el lugar de inyección había sido el adecuado, se extraía la laringe del animal y se analizaba cuidadosamente con la lupa binocular.

Cuatro días después del sacrificio, los troncos encefálicos eran congelados y cortados, mediante un criostato (Leitz Kryostat 1720), en secciones transversales de 50 μ m de espesor. Las secciones se depositaban de manera consecutiva, "seriada", en los pocillos de una placa multipocillo que contenían tampón fosfato (pH 7,4; 0,1 M). La

secuencia completa de cortes contenidos en la placa se conservaba a 4°C hasta el momento de ser procesadas para la observación al microscopio.

Antes de ser montadas en los portaobjetos, todas las secciones fueron incubadas durante 10 minutos con DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol di-clorhidrato; 1:1000). Este producto se une de manera inespecífica al surco menor de la doble hebra del ADN y, bajo la luz del microscopio de fluorescencia, emite un característico y brillante color azul que permite identificar de manera inequívoca el núcleo celular de todas las células (Kapuscinski 1995). La incorporación de este protocolo en los experimentos se hizo para, de manera fiable, identificar el núcleo y el nucleolo de las neuronas y permitir contarlas evitando la cuantificación repetida de algunas de ellas (ver "3.2.4- Identificación, cuantificación, ubicación y morfometría de las neuronas trazadas"). Finalmente, las secciones fueron montadas de manera seriada en portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina. Los portaobjetos se dejaban secar al aire y, una vez secos, se cubrían con cubreobjetos utilizando un medio de montaje que previene y retarda la pérdida de la fluorescencia (Vectashield, Vector), sellándose el conjunto con laca de uñas. Todas las preparaciones se guardaban a 4°C y se observaban y fotografiaban al día siguiente.

MICROSCOPIA Y OBSERVACIÓN

Las preparaciones eran observadas con un microscopio Nikon Eclipse E800 con equipo de epifluorescencia con los filtros adecuados a las longitudes de onda en las que emiten los fluoróforos empleados: filtro EX 510/60; DM 575 para Alexa Fluor 594 y Texas Red; filtro ultravioleta EX 330/380; DM 400 para DAPI; filtro EX 450/90, DM 505 para Alexa Fluor 488 y fluoresceína. El registro fotográfico se hizo mediante una

cámara digital Nikon acoplada al microscopio y las imágenes fueron posteriormente procesadas mediante el programa Adobe Photoshop CS3.

3.2.4-IDENTIFICACIÓN, CUANTIFICACIÓN, UBICACIÓN Y MORFOMETRÍA DE LAS NEURONAS TRAZADAS

Observadas en el microscopio de fluorescencia, las neuronas que habían captado y transportado el trazador hasta el cuerpo neuronal presentaban un depósito fluorescente de aspecto granulado relleno del soma celular, con el núcleo libre de producto. Para el recuento de las mismas, desarrollamos una variante del método descrito por McHanwell y Biscoe (McHanwell y Biscoe, 1981) de la siguiente manera. Las secciones eran examinadas a 40x y tras localizar una neurona con los parámetros arriba descritos, se cambiaba el filtro para observar la sección en la tinción con DAPI e identificar la presencia, o no, del nucleolo. Cuando el nucleolo era identificado la neurona quedaba cuantificada y registrada, mientras que si el nucleolo no se apreciaba la neurona no se consideraba. De esta manera, evitábamos la posibilidad de cuantificar dos veces la misma neurona al quedar seccionada en dos cortes consecutivos, dado que la probabilidad de que el nucleolo también quedara seccionado es prácticamente nula. En todos los casos, las secciones fueron analizadas, y el recuento de las células hecho, por dos observadores independientes.

Como referencia para identificar todas las estructuras del tronco del encéfalo se ha utilizado el atlas del sistema nervioso central de la rata publicado por Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 2005). La determinación de la posición de neuronas trazadas fue establecida con respecto al óbex. No obstante, se aplicó un factor de compensación puesto que no es posible orientar todas las muestras con la precisión necesaria para obtener secciones perfectamente paralelas al plano de sección. Para ello se identificaron, además del óbex, los orígenes aparentes de ambos nervios vestibulococleares, quedando como valiosos testigos de la exactitud del plano de sección del tronco encefálico. Así, cuando se observaba el origen aparente de los dos nervios vestibulococleares en la misma sección, se podía asumir que el plano de corte

era perfectamente transversal con respecto al eje longitudinal del tronco del encéfalo, mientras que, de no ser así, se establecía la distancia apreciada entre ambos orígenes aparentes y se aplicaba la siguiente fórmula:

$$\text{Distancia real al óbex} = \text{distancia medida al óbex} \pm \left[\frac{v1 - v2}{2} \right]$$

Siendo:

- v1. Distancia al óbex del origen del nervio vestibulococlear que aparece en primer lugar (el más caudal de los dos).
- v2. Distancia al óbex del origen del nervio vestibulococlear que aparece en segundo lugar (el más craneal de los dos).
- Suma o resta del valor de compensación ($\pm [(v1-v2)/2]$): se suma cuando la columna de neuronas trazadas son contralaterales al nervio vestibulococlear más caudal y se resta cuando es ipsilateral.

En algunos experimentos, sobre todo en las primeras cirugías, se encontraron algunas neuronas trazadas situadas fuera del núcleo ambiguo. Estas neuronas también fueron registradas y localizadas para determinar razonadamente que estructura había sido contaminada accidentalmente durante la inyección del trazador en el músculo laríngeo intrínseco. Con el perfeccionamiento de la técnica de inyección, tan solo muy ocasionalmente ha vuelto a ser observada alguna de estas neuronas.

El tamaño de las neuronas fue analizado mediante el programa Image J empleando las imágenes recogidas de las neuronas trazadas en formato *tif*. Se tomaron medidas del área, el perímetro y los diámetros mayor y menor. Para cada uno de esos parámetros se obtuvo la media y se calculó el error estándar.

4.- RESULTADOS

4.- RESULTADOS

4.1- INYECCIONES EN EL MÚSCULO CRICOTIROIDEO

Es en este músculo, por su facilidad de abordaje, en el que se ha obtenido un mayor porcentaje de experimentos con éxito.

SITUACIÓN DE LAS NEURONAS

Todas las neuronas trazadas desde el músculo cricotiroideo se ubicaban en el núcleo ambiguo (Fig. 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3.), exceptuando la presencia de alguna neurona aislada que, como ya quedó descrito en el punto 3.2.4, fueron trazadas accidentalmente por la difusión incontrolada de alguna pequeña cantidad de trazador.

Las neuronas se encontraban distribuidas en una columna rostrocaudal que abarcaba desde los $1436 \pm 191 \mu\text{m}$ hasta los $2364 \pm 150 \mu\text{m}$, con una mediana de $1914 \pm 150 \mu\text{m}$. El 50% del total de las neuronas trazadas quedaba, no obstante, concentrado en tan solo $300 \mu\text{m}$ de longitud, entre los $1817 \pm 133 \mu\text{m}$ y los $2120 \pm 176 \mu\text{m}$. Esta distribución muestra la existencia de una única población de motoneuronas localizadas en torno a la mediana, con un pequeño número de neuronas dispersas rostral y caudalmente a la concentración (Tabla 4.1.1, Fig. 4.1.4.). Por otra parte, la población de motoneuronas del músculo cricotiroideo es la más rostral de los tres músculos estudiados.

NUMERO DE NEURONAS

El número medio de neuronas trazadas fue de 41 ± 9 (Tabla 4.1.1), con números comprendidos entre 21 y 51.

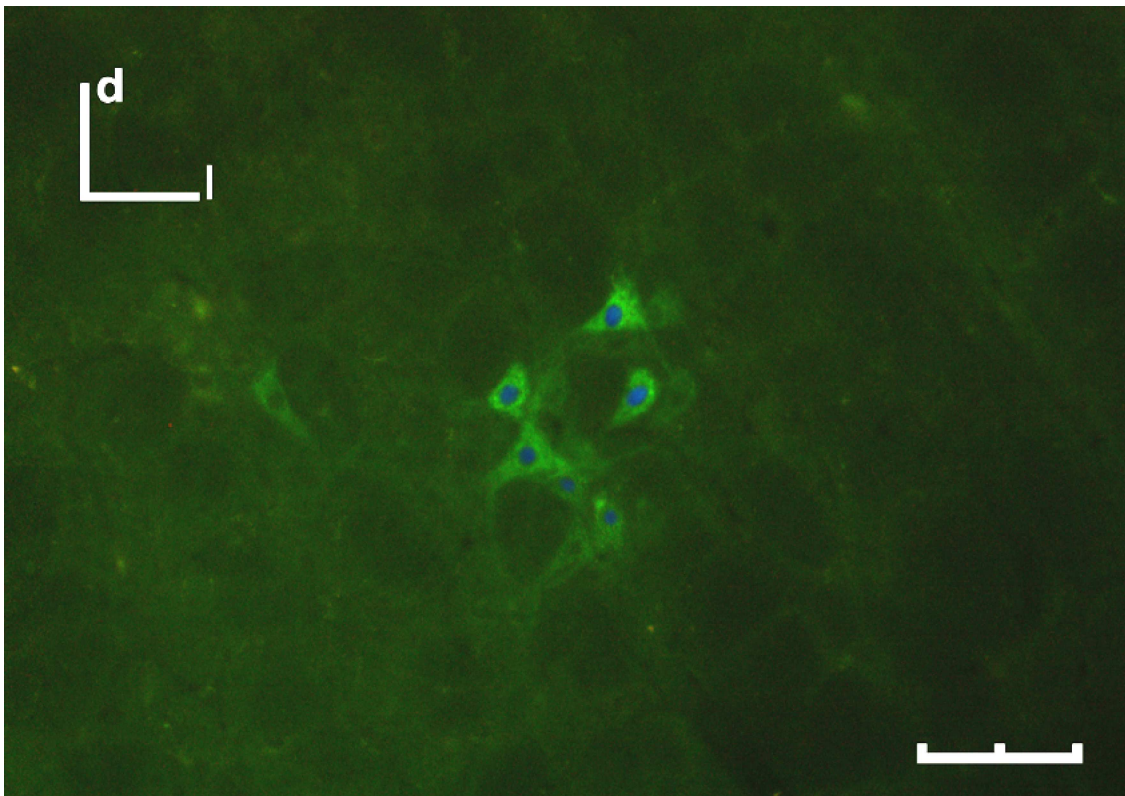


Figura 4.1.1 Imagen de un grupo de ocho neuronas agrupadas en el núcleo ambiguo y trazadas tras la inyección en el músculo cricotiroideo de CT β conjugada a Alexa Fluor 488. Los núcleos están marcados con DAPI. Calibración: 50 μ m.

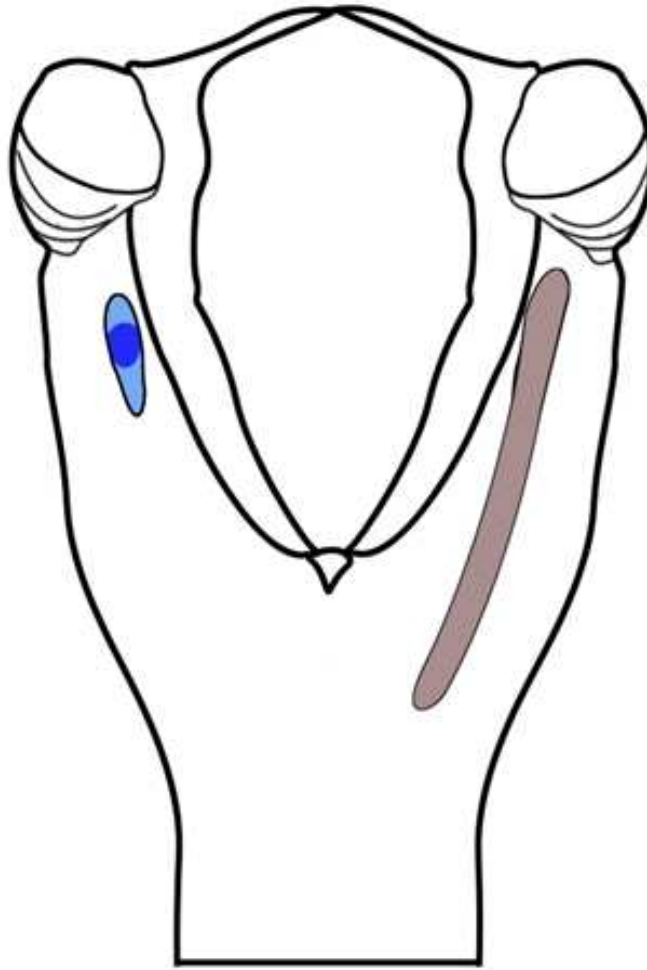


Figura 4.1.2 Representación somatotópica del músculo cricotiroides en el núcleo ambiguo (azul, lado izquierdo) comparada con toda la longitud de la columna del núcleo ambiguo (en el lado derecho). En azul oscuro se muestra el área que ocupa el 50% de las neuronas del músculo.

Número medio de neuronas	Posición	Posición 50% neuronas	Mediana	Ejes (Mayor Menor)
41 ± 9	r: 2364 ± 150 c: 1436 ± 191	r: 2120 ± 176 c: 1817 ± 133	1914 ± 150	32 ± 9 20 ± 4

Tabla 4.1.1 Resumen de los datos de las neuronas trazadas desde el músculo cricotiroides.

r rostral
c caudal

Todos las cifras en μm .

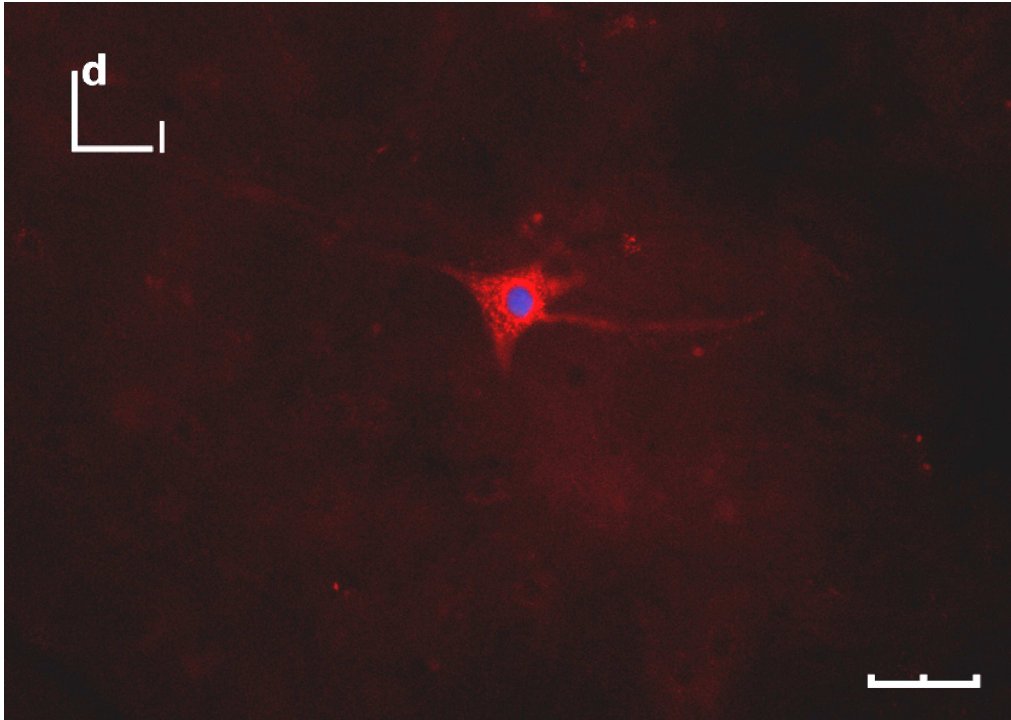


Figura 4.1.3 Imagen de una neurona trazada tras inyectar en el músculo cricotiroido CTβ conjugada a Alexa Fluor 594. La neurona está rostral a la concentración principal de neuronas del músculo cricotiroido. El núcleo está marcado con DAPI. Calibración: 50 μm.

MORFOMETRIA

La morfología mayoritaria de las neuronas trazadas es multipolar (Fig. 4.1.3), aunque también se encontraron algunas fusiformes. Para las neuronas multipolares la longitud media de su diámetro mayor fue de $32 \pm 9 \mu\text{m}$ y del menor de $20 \pm 4 \mu\text{m}$. (Tabla 4.1.1., Fig. 4.1.4.).

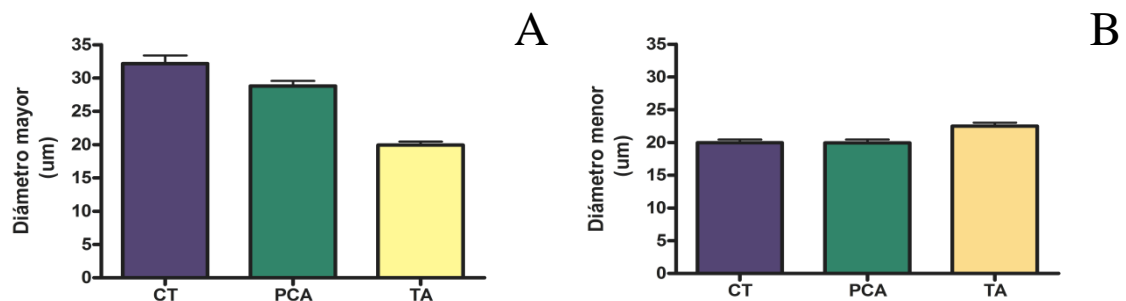


Figura 4.1.4. Gráficas de las dimensiones medias de las motoneuronas laríngeas. **A.** Media del eje mayor de las neuronas. **B.** Media del eje menor de las neuronas.

CT: cricotiroido; PCA: cricoaritenoido posterior; TA: tiroaritenoido.

4.2- INYECCIONES EN EL MÚSCULO CRICOARITENOIDEO POSTERIOR

Por las dificultades en su abordaje para la inyección este músculo fue el último en el que logramos trazados neuronales satisfactorios.

SITUACIÓN DE LAS NEURONAS

Todas las neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenideo posterior se localizaron en el núcleo ambiguo, aunque hasta que la técnica de inyección fue afinada encontramos, en muchas ocasiones, neuronas trazadas distribuidas fuera del mismo, contaminadas accidentalmente por la difusión incontrolada del trazador. La población de neuronas trazadas tras la inyección de toxina colérica en el músculo cricoaritenideo posterior (Fig. 4.2.1) se localiza en el núcleo ambiguo, en una columna rostrocaudal comprendida entre los $944 \pm 146 \mu\text{m}$ y los $1983 \pm 202 \mu\text{m}$, con una mediana de 1500 ± 258 . La mitad de las neuronas trazadas se localizan en un intervalo de $350 \mu\text{m}$ entre los $1309 \pm 273 \mu\text{m}$ y los $1699 \pm 267 \mu\text{m}$. Esta distribución se corresponde con la de una única población de neuronas (Tabla 4.2.1, Fig. 4.2.2).

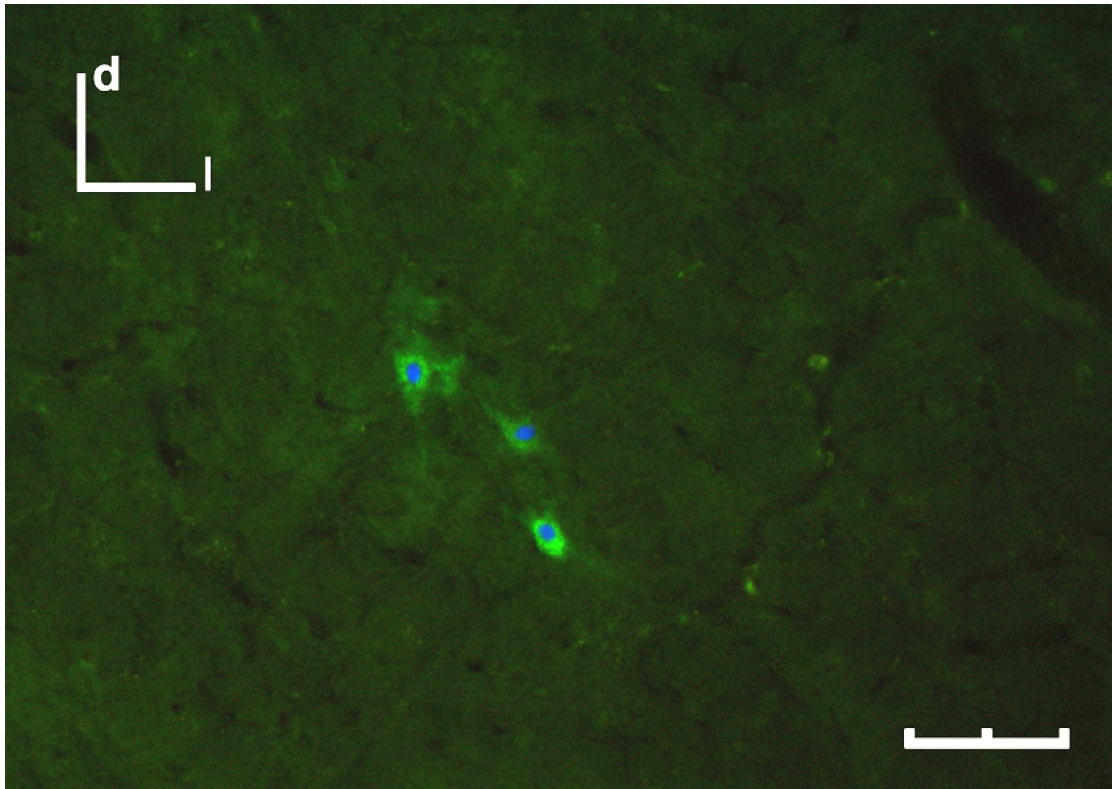


Figura 4.2.1. Imagen de un grupo de neuronas trazadas tras la inyección del músculo cricoaritenideo posterior con CT β conjugada a Alexa Fluor 488. Los núcleos están teñidos con DAPI. Calibración: 100 μ m.

NUMERO DE NEURONAS

El número medio de neuronas trazadas fue de 39 ± 11 , siendo el número mínimo contabilizado de 20 y el máximo de 51 (Tabla 4.2.1).

Número medio de neuronas	Posición	Posición 50% neuronas	Mediana	Ejes (Mayor Menor)
39 ± 11	r: 1983 ± 202 c: 944 ± 146	r: 1699 ± 267 c: 1309 ± 273	1500 ± 258	29 ± 5 20 ± 3

Tabla 4.2.1 Resumen de los datos de las neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenideo posterior.

r rostral
c caudal

Todos las cifras en μ m.

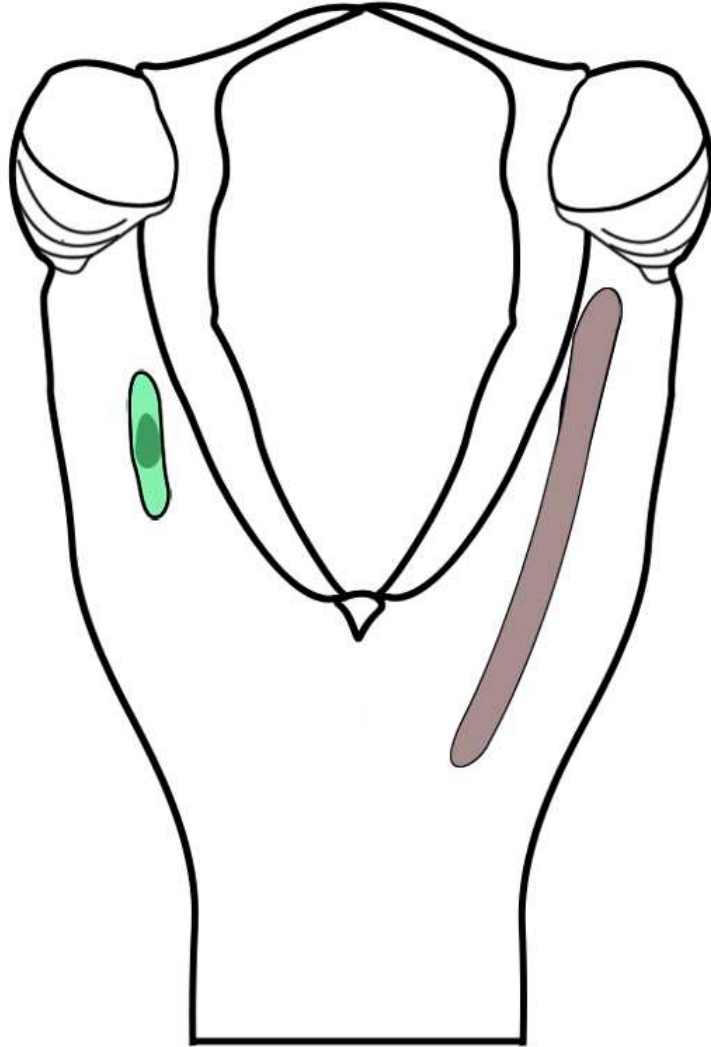


Figura 4.2.2. Representación somatotópica del músculo cricoaritenideo posterior en el núcleo ambiguo (verde, lado izquierdo) comparada con toda la longitud de la columna del núcleo ambiguo (marrón, lado derecho). En verde oscuro se muestra el área que ocupa el 50% de las neuronas del músculo.

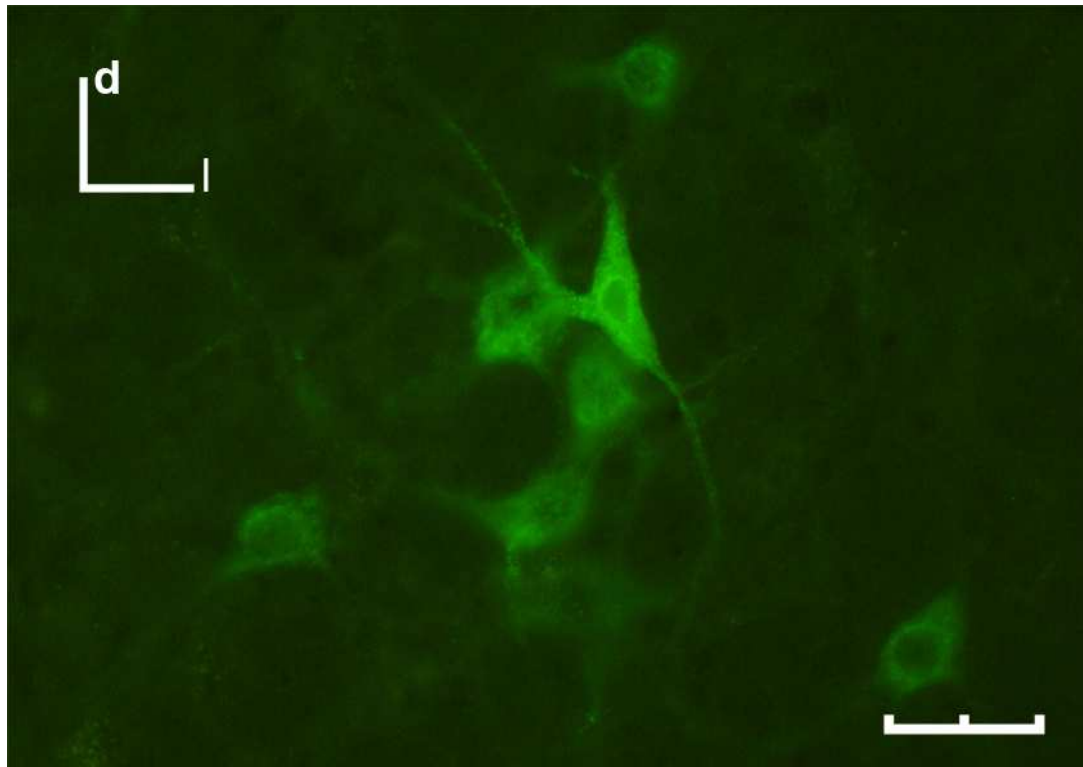


Figura 4.2.3. Imagen de un grupo de neuronas trazadas tras la inyección en el músculo cricoaritenoides posterior de CT β conjugada a Alexa Fluor 488. La morfología de estas neuronas es multipolar. Calibración: 50 μ m.

MORFOMETRIA

Al igual que en el caso de las motoneuronas del músculo cricotiroideo, las motoneuronas del músculo cricoaritenoides posterior presentaron mayoritariamente una morfología multipolar (Fig. 4.2.3), aunque también se hallaron neuronas fusiformes. Para las multipolares, el diámetro mayor medio es de $29 \pm 5 \mu$ m y, para el menor, de $20 \pm 3 \mu$ m (Tabla 4.2.1, Fig. 4.1.4).

4.3.-INYECCIONES EN EL MÚSCULO TIROARITENOIDEO

Este músculo está protegido por el cartílago tiroides y para su inyección era preciso realizar una ventana en dicho cartílago (Figura 4.3.1). Facilitado el acceso al músculo la inyección exigía un control cuidadoso para no depositar accidentalmente toxina colérica en las fibras del músculo cricoaritenideo lateral. Otro aspecto que había que cuidar era el sangrado después de realizada la inyección pues, en algún caso, el resultado fue el escaso o nulo trazado de neuronas en el tronco del encéfalo.

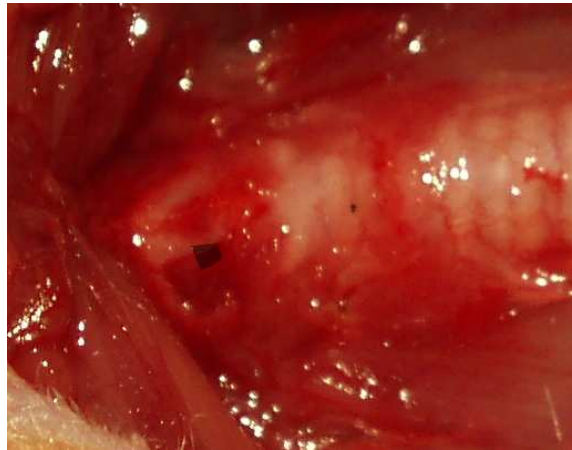


Figura 4.3.1 Ventana en el cartílago tiroides

SITUACIÓN DE LAS NEURONAS

Al igual que con los otros músculos, los cuerpos de las motoneuronas que inervan este músculo se encuentran localizadas únicamente en la medula oblongada, próximas al extremo caudal del cuarto ventrículo, formando una columna de ubicación ventrolateral que se corresponde con el núcleo ambiguo. La población trazada se localiza caudalmente a continuación de la correspondiente al músculo cricoaritenideo posterior (Figura 4.3.2, figura 4.3.3).

Su distribución, en una columna ubicada de caudal a rostral y tomando el óbex como referencia, se sitúa entre $350 \pm 164 \mu\text{m}$, caudalmente al óbex, y $755 \pm 159 \mu\text{m}$, rostralmente al óbex. La posición media de la está en $197 \pm 86 \mu\text{m}$ y el 50% de las neuronas trazadas se localiza en una región rostral al óbex de $350 \mu\text{m}$ desde $19 \pm 99 \mu\text{m}$ hasta $369 \pm 119 \mu\text{m}$. Esta distribución repite el patrón observado para los otros dos músculos estudiados con una región de mayor densidad neuronal y, en torno a ella, el resto de la población más dispersa.

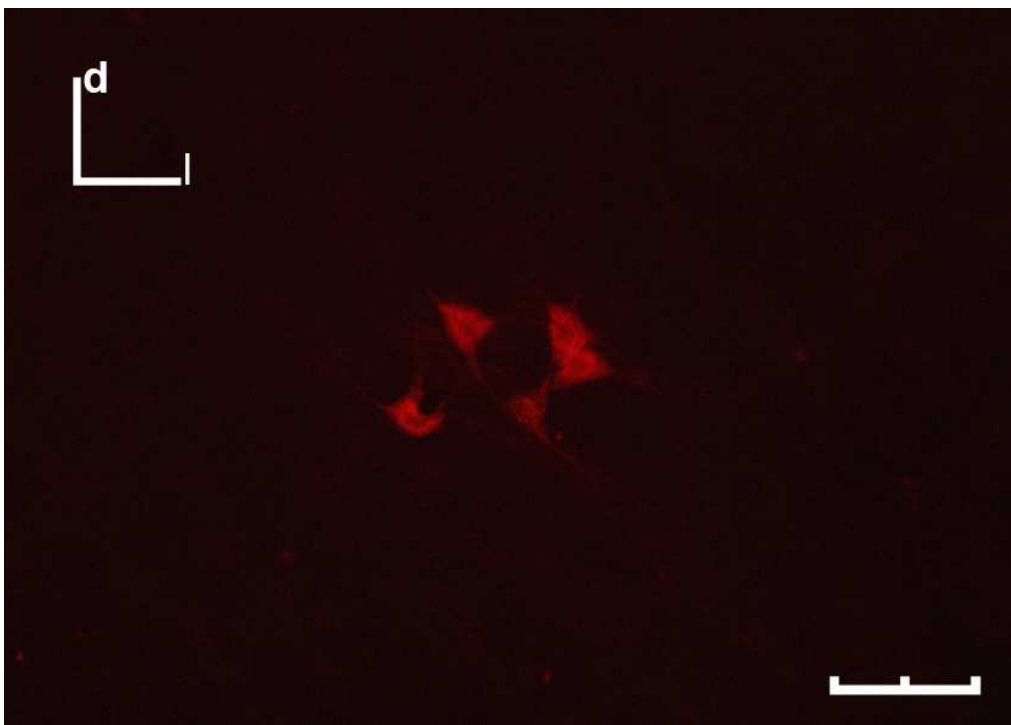


Figura 4.3.2. Imagen de un grupo de cinco neuronas del núcleo ambiguo trazadas desde el músculo tiroaritenoides mediante una inyección de toxina colérica conjugada a Texas Red. Calibración: $100 \mu\text{m}$

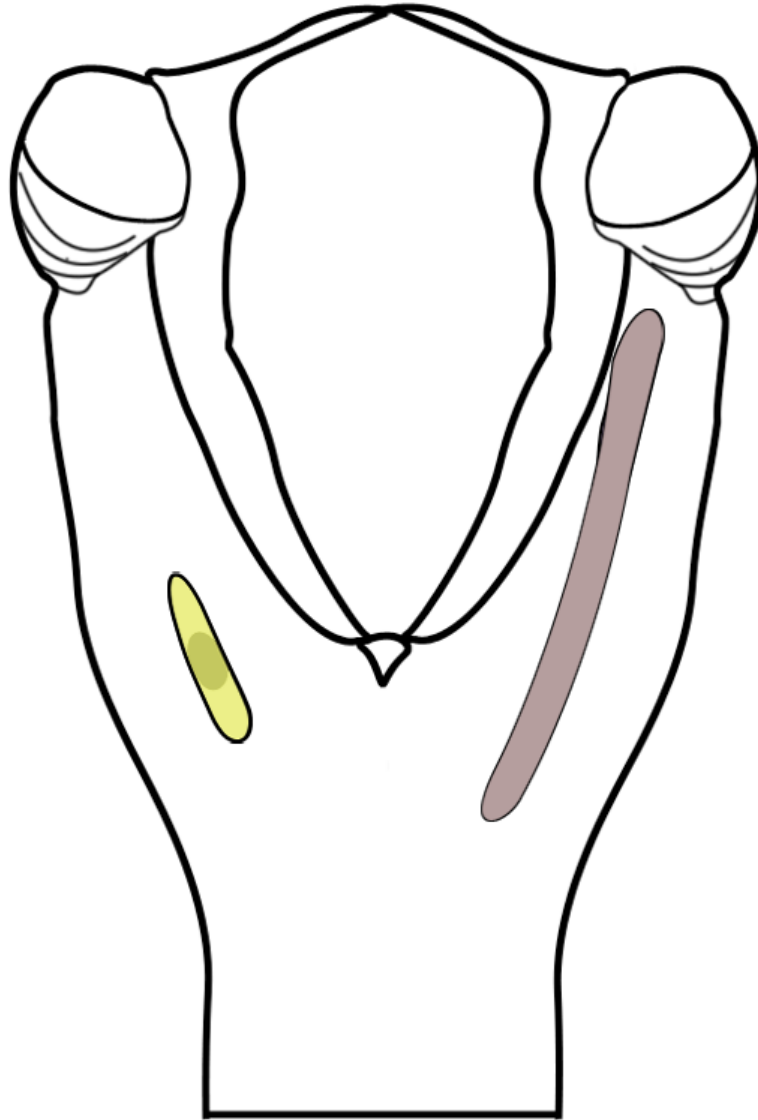


Figura 4.3.3. Representación somatotópica del músculo tiroaritenideo en el núcleo ambiguo (amarillo, lado izquierdo) comparada con toda la longitud de la columna del núcleo ambiguo (en el lado derecho). En amarillo oscuro se muestra el área que ocupa el 50% de las neuronas del músculo.

NÚMERO DE NEURONAS

El número medio de neuronas trazadas en el núcleo ambiguo ha sido 33 ± 12 (Tabla 4.3.1).

Número medio de neuronas	Posición	Posición 50% neuronas	Mediana	Ejes (Mayor Menor)
33 ± 12	r: 755 ± 159 c: -350 ± 164	r: 369 ± 119 c: 19 ± 99	197 ± 86	33 ± 6 22 ± 3

Tabla 4.3.1. Resumen de los datos de las neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenoido.

r rostral
c caudal

Todas las cifras en μm .

MORFOMETRÍA

Las neuronas trazadas presentan, mayoritariamente, una morfología multipolar (Figura 4.3.4), identificándose ocasionalmente alguna neurona fusiforme. La media del diámetro mayor de sus cuerpos neuronales es de $33 \pm 6 \mu\text{m}$ y, para el menor, de $22 \pm 3 \mu\text{m}$ (Tabla 4.3.1, figura 4.3.4).

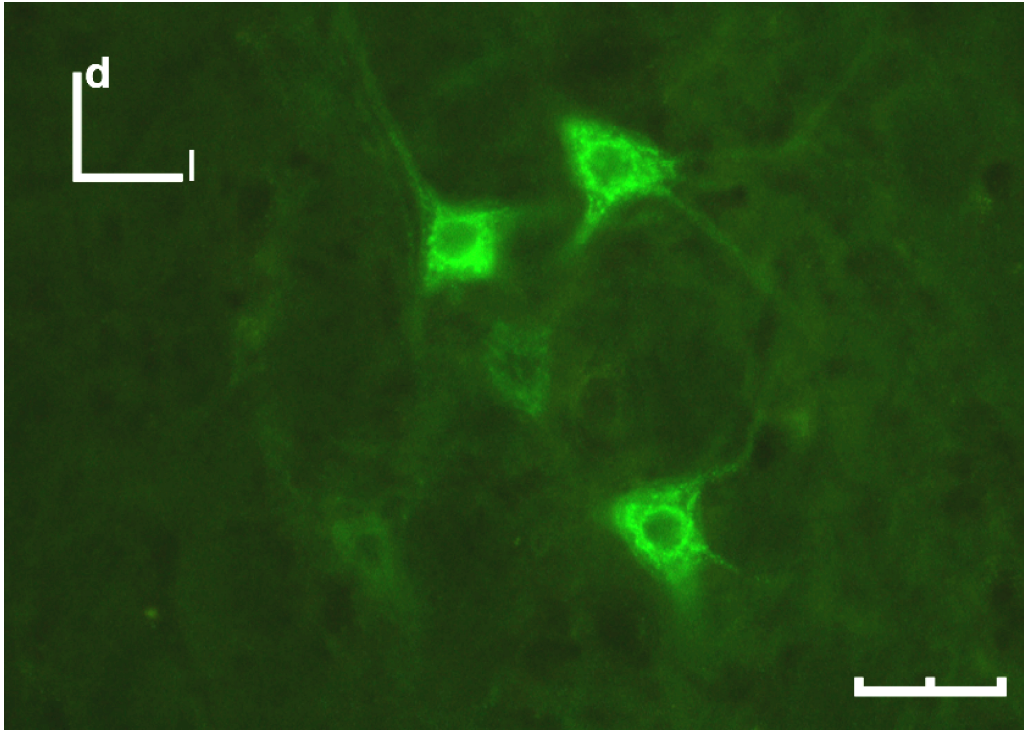


Figura 4.3.4. Imagen de tres motoneuronas de morfología multipolar tomadas a 20X trazadas desde el músculo tiroaritenideo. Escala 50 μ m.

4.4- INYECCIONES IPSILATERALES DE DOS MÚSCULOS

Además de las inyecciones individuales de cada uno de los músculos que hemos seleccionado para nuestro estudio, hemos realizado inyecciones ipsilaterales de las distintas combinaciones de dos de esos tres músculos con el fin de comprobar físicamente si se producía o no solapamiento de las poblaciones neuronales correspondientes a cada uno de ellos. Para ello, cada músculo fue trazado con la toxina colérica conjugada a un fluoróforo diferente, con el fin de poder visualizar en el tronco del encéfalo las neuronas correspondientes a cada músculo en un color diferente. Los resultados obtenidos en estos experimentos se detallan a continuación.

INYECCIÓN DE LOS MÚSCULOS CRICOTIROIDEO Y CRICOARITENOIDEO POSTERIOR

Hemos realizado varios intentos de trazado desde estos dos músculos pero en ningún caso hemos obtenido un resultado satisfactorio, pues nunca obtenemos neuronas trazadas para el músculo cricotiroideo. Entre las posibles razones que expliquen este resultado, barajamos la posibilidad de que en el abordaje para la inyección del músculo cricoaritenideo posterior se lesione accidentalmente el nervio laríngeo superior por lo que la toxina colérica inyectada en el músculo cricotiroideo no puede transportarse hasta los cuerpos neuronales ubicados en el núcleo ambiguo.

Sin embargo, de las series experimentales para el trazado de los músculos cricotiroideo y cricoaritenideo posterior por separado, se puede concluir que hay una región de solapamiento para estos dos músculos de una longitud aproximada a 500 μm , localizada rostralmente al obex entre $1440 \pm 190 \mu\text{m}$ y $1980 \pm 200 \mu\text{m}$ (Figura 4.4.1).

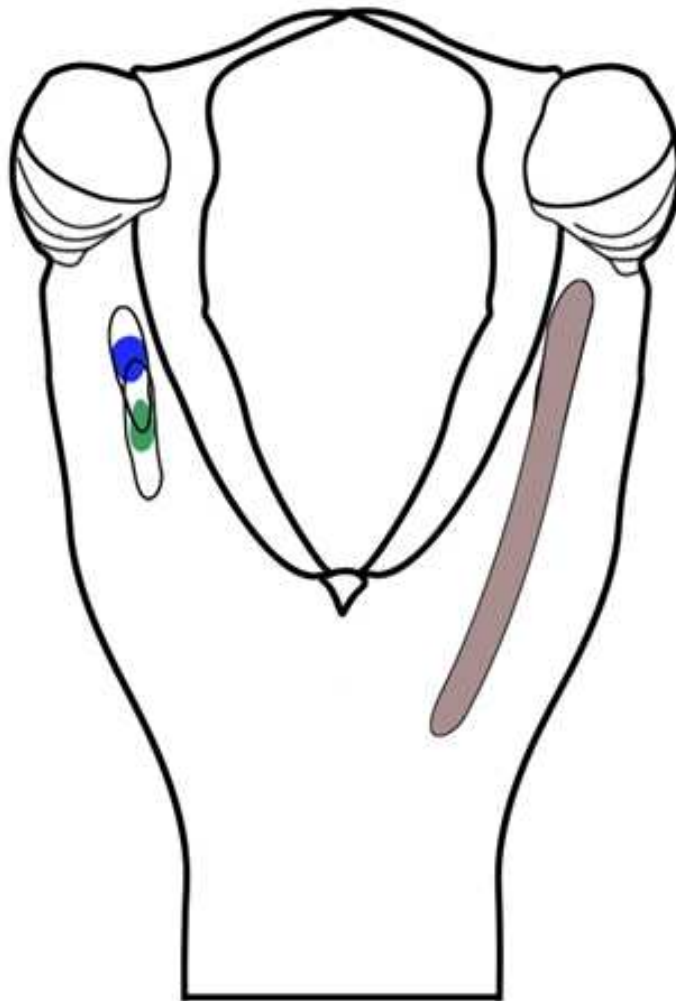


Figura 4.4.1. En el lado izquierdo se muestra la representación somatotópica de los músculos cricotiroideo (territorio que incluye el área azul) y cricoaritenideo posterior (territorio que incluye el área verde), comparada con toda la longitud del núcleo ambiguo en el lado derecho (marrón). Nótese el territorio de solapamiento entre ambas poblaciones neuronales. Las áreas azul y verde corresponden al territorio dónde se ubica el 50% de las neuronas trazadas para cada músculo.

INYECCIONES DE LOS MÚSCULOS CRICOTIROIDEO Y TIROARITENOIDEO

En dos animales se inyectaron ipsilateralmente los músculos cricotiroideo y tiroaritenideo. La distribución y el número de neuronas trazadas al inyectar ambos músculos son análogos a las descritas cuando los músculos fueron trazados individualmente, con las neuronas trazadas desde el músculo cricotiroideo en posición

rostral y las correspondientes al músculo tiroaritenoido caudalmente, sin ningún territorio de solapamiento entre ambas poblaciones (Figura 4.4.2.).

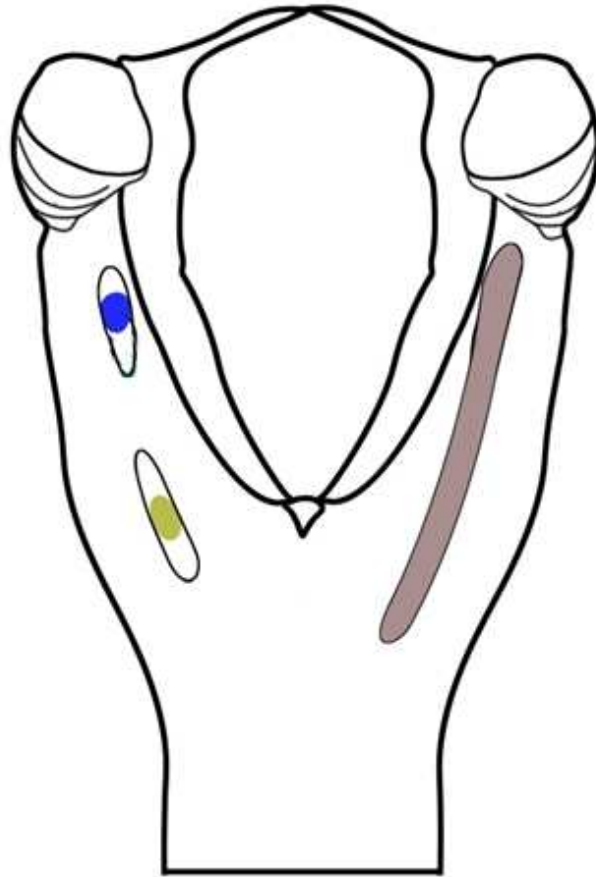


Figura 4.4.2. En el lado izquierdo se muestra la representación somatotópica de los músculos cricotiroideo (territorio que incluye el área azul) y tiroaritenoido (territorio que incluye el área verde), comparada con toda la longitud del núcleo ambiguo en el lado derecho (marrón). Nótese que no hay solapamiento entre ambas poblaciones neuronales. Las áreas azul y verde corresponden al territorio dónde se ubica el 50% de las neuronas trazadas para cada músculo.

MUSCULOS CRICOARITENOIDEO POSTERIOR Y TIROARITENOIDEO

En un total de cinco ratas se ha inyectado toxina colérica en estos dos músculos ipsilateralmente. Las neuronas que inervan el músculo cricoaritenoido posterior están distribuidas rostralmente a las correspondientes al músculo tiroaritenoido,

pero hay una pequeña área de solapamiento entre ambos músculos de unos 100 μm (Figuras 4.4.3. y 4.4.4.).

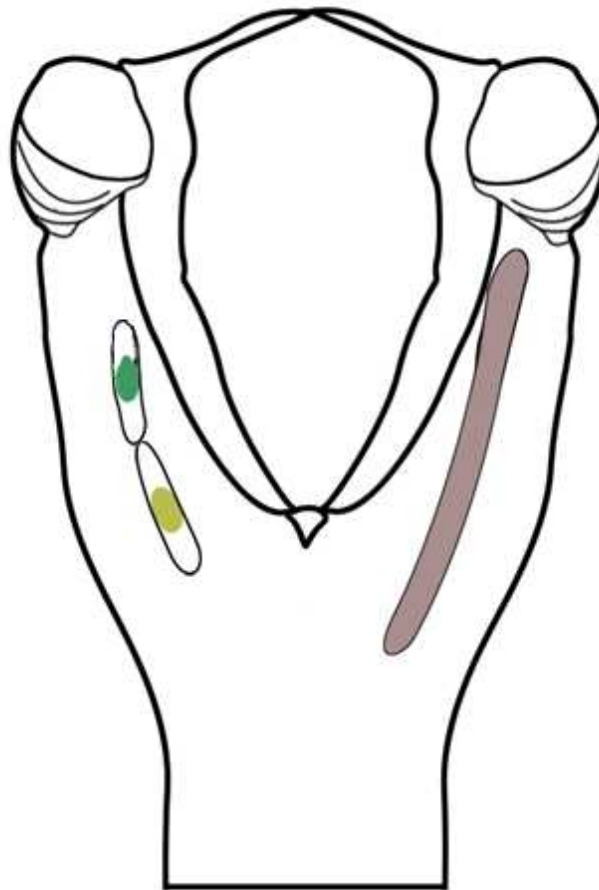


Figura 4.4.3. En el lado izquierdo se muestra la representación somatotópica de los músculos cricoaritenoides posterior (territorio que incluye el área verde oscuro) y titoaritenoides (territorio que incluye el área verde claro), comparada con toda la longitud del núcleo ambiguo en el lado derecho (marrón). Nótese el pequeño territorio de contacto entre ambas poblaciones neuronales. Las áreas verde oscuro y verde claro corresponden al territorio dónde se ubica el 50% de las neuronas trazadas para cada músculo.

En concreto, la situación de este área abarcaba los 100 μm comprendidos entre 800 y 900 μm rostral al óbex (Figura 4.4.4).

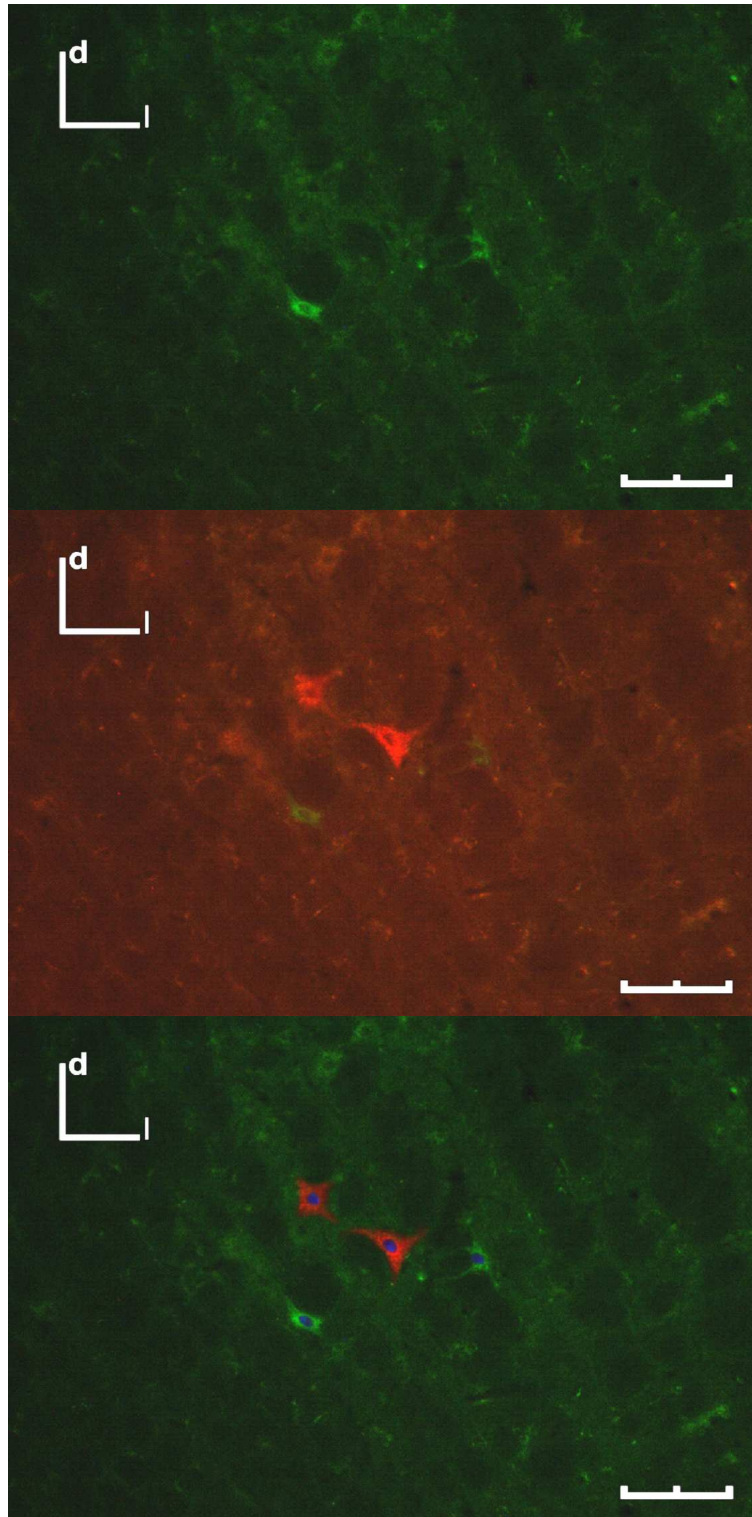


Figura 4.4.4. a. Neuronas trazadas desde el músculo cricoaritenoides posterior. b. Neuronas trazadas desde el músculo tiroaritenoides. c. Imagen fusionada de a y b que muestra como hay un territorio de solapamiento de las neuronas trazadas desde ambos músculos.

5.- DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN

5.1 MÚSCULO CRICOTIROIDEO

NÚMERO DE NEURONAS

El músculo cricotiroideo es el único músculo intrínseco de la laringe inervado por el nervio laríngeo superior (Szentagothai, 1943; Gacek, 1977; Schweizer y cols., 1981; Bieger y Hopkins, 1987; Kobler y cols., 1994).

En nuestro estudio, todas las neuronas marcadas se situaban agrupadas en los límites del territorio del núcleo ambiguo (Paxinos y Watson, 2005). El conteo de las motoneuronas marcadas mostraba un número entre 21 y 51. Sumados todos los experimentos el número medio de neuronas fue de 41 ± 9

En las inyecciones de este músculo en el modelo de gato, Gacek contabilizó entre 320 y 354 neuronas distribuidas en los núcleos retrofacial y ambiguo (Gacek 1975). Este número es muy superior al encontrado por nosotros.

Por otra parte, el número obtenido por nosotros no es muy diferente del obtenido por otros autores en la rata. En el trazado con HRP de Hinrichsen y Ryan el número de motoneuronas marcadas para este músculo estaba entre 50 y 96 (Hinrichsen y Ryan, 1981). En los ensayos realizados por Portillo y Pásaro para su artículo de 1988, en un modelo de rata, el número de neuronas para el músculo cricotiroideo fue de entre 22 y

81, siendo 42 neuronas su número medio, que es una media equivalente al de nuestros propios experimentos. Por otra parte, mediante el trazado de la rama motora que inerva el músculo cricotiroideo a través del nervio laríngeo superior con el marcador HRP logró un marcaje de 30 neuronas (Furusawa y cols., 1996).

Existen otros dos trabajos realizados en la rata en los que no se hacen distinción alguna de las neuronas que inervan cada músculo, sino que se describe de modo general el número de neuronas del núcleo ambiguo. De esta manera, se han descrito un número de entre 100 y 300 neuronas en la representación laríngea del núcleo ambiguo (Pásaro y cols., 1981), o un número de 140 neuronas en la formación laxa del núcleo ambiguo, que inerva todos los músculos intrínsecos laríngeos excepto el cricotiroideo, así como 170 neuronas en la formación semicompacta, que inerva el músculo cricotiroideo y la musculatura faríngea (Bieger y Hopkins, 1987).

AUTORES	ANIMAL	METODOLOGÍA	NÚMERO DE NEURONAS	IPSILATERAL O BILATERAL	POSICIÓN ROSTRO-CAUDAL	MORFOMETRÍA **
Szentágothai, 1943	Perro	Electroestimulación		IPSILATERAL	4,0	
Gacek, 1975	Gato	HRP	rf 203-228 na 92-151	IPSILATERAL	Núcleo retrofacial rostral y ambiguo caudal	
Kalia y Mesulam, 1980 b	Gato	HRP		IPSILATERAL	Núcleo ambiguo	40-50
Hinrichsen y Ryan, 1981	Rata	HRP	24-66	IPSILATERAL	Núcleo ambiguo en posición rostral al óbex	2 tamaños 830µm ² y 400µm ²
Schweizer y col., 1981	Murciélago	HRP		IPSILATERAL	Núcleo ambiguo en posición rostral	15
Yoshida y col., 1982	Gato	HRP		IPSILATERAL	Núcleo retroambiguo únicamente	
Portillo y Pávaro, 1988	Rata	True Blue y Diamino Yellow	50 (TB) 70 (DY)	IPSILATERAL	r 2,0 c 1,3	l 15-25
Furusawa y col., 1996	Rata Sprague Dawley	HRP	30	IPSILATERAL	r 2,5 c 1,5	l 20,3 ± 1,75
Saxon et al, 1996	Rata	HRP-WGA		IPSILATERAL		l 38,7 ± 7 a 29,2 ± 4,8 †
Hayakawa et al, 1999	Rata Sprague Dawley	CTβ		IPSILATERAL		l 47,7 ± 1,9 a 28 ± 1,9
NOSOTROS	Rata Sprague Dawley	CTβ	41 ± 9	IPSILATERAL	r 1,4 c 2,4	l 32 ± 9 a 20 ± 4

Tabla 5.1.1. Resultados de los estudios de la inervación del músculo cricotiroides. Comparación entre autores. Abreviaturas, r: rostral; c: caudal; l: largo; a: ancho; na: núcleo ambiguo; rf: núcleo retrofacial; DY: diamino amarillo; TB: true blue; HRP: peroxidasa de rábano picante; CTβ: subunidad β de la toxina colérica.
* en mm; ** en µm; † Tamaño estimado para toda la formación semicompacta

POSICIÓN DENTRO DEL NÚCLEO AMBIGUO

En nuestros resultados, la subpoblación de este músculo se encuentra entre 1,4 y 2,4 mm rostral al óbex. Esta subpoblación se encuentra en la región más rostral en comparación con el resto de la musculatura laríngea, inmediatamente caudal al polo caudal del núcleo motor del nervio facial, en una posición equivalente a la descrita como formación semicompacta por Bierger y Hopkins (1987). El 50% de las neuronas trazadas se localizan en una región de tan solo 300 μm de longitud, entre 1,8 mm y 2,1 mm. La mediana de esta subpoblación es 1,9 mm. Esta distribución muestra la existencia de una única concentración de motoneuronas en torno a la mediana. Fuera de esta agrupación se encuentra un pequeño número de neuronas dispersas a lo largo de la columna rostral y caudalmente a la concentración.

En su ya clásico artículo, Bierger y Hopkins (1987) determinan que la organización viscerotópica del NA está constituida por dos divisiones principales:

- División ventral. Es la formación externa, formada por neuronas eferentes preganglionares parasimpáticas cardíacas.
- División dorsal. Está formada por las neuronas eferentes que inervan los músculos estriados de la laringe, la faringe y el esófago. Esta división, a su vez, puede ser dividida a su vez en tres subdivisiones organizadas rostrocaudalmente:
 - Formación compacta: Es la subdivisión más rostral. Proyecta a todos los niveles del esófago, es decir, es la subdivisión esófagomotora.
 - Formación semicompacta: Es la subdivisión intermedia que se extiende caudalmente a la formación compacta, aunque algunas de las neuronas que inervan el músculo cricotiroideo se sitúan en el mismo plano que la

formación compacta. Contiene las neuronas que inervan los músculos constrictores de la faringe y el músculo cricotiroideo.

- Formación laxa: Es la subdivisión más caudal. Contiene las motoneuronas que proyectan sus fibras para inervar a los músculos intrínsecos de la laringe, con excepción del músculo cricotiroideo.

La organización de esta subpoblación en nuestros experimentos de marcaje se encuentra de acuerdo con diversos autores, como por ejemplo en el trabajo pionero de Szentagothai (1943), donde plantea un protocolo de estimulación y lesión del núcleo ambiguo por transmisión de corriente eléctrica que, realizado en perros, muestra que las motoneuronas de este músculo están situadas en la región más rostral del núcleo ambiguo.

Por otra parte, en los experimentos de Gacek (1975) empleando el trazado de HRP, el marcaje de las motoneuronas para este músculo estaría localizado en los núcleos retrofacial rostral y ambiguo caudal. Sin embargo, utilizando los mismos trazadores HRP en los músculos laríngeos del gato Yoshida y colaboradores (1982) describen una organización similar a la descrita por Szentagothai (1943).

La organización de las motoneuronas del músculo cricotiroideo en la rata también se dispone en la región más rostral del núcleo ambiguo. Siendo más específicos, para Portillo y Pásaro (1988) se localiza en una región rostral del núcleo ambiguo entre 1,3 mm y 2 mm. Esta organización rostrocaudal presenta un polo rostral diferente al especificado por nosotros, mientras que el polo caudal si resulta más ajustado a nuestros resultados.

Por último, la inyección de la rama motora del nervio laríngeo superior, sí da como resultado un conjunto de neuronas trazadas cuya localización es prácticamente equivalente a la obtenida en nuestras series de inyección del músculo cricotiroido (Furusawa y cols., 1996).

MORFOMETRIA

Nuestras medidas de diámetro mayor para las motoneuronas de este músculo han sido de 32 ± 9 y un diámetro menor de 20 ± 4 μm . Las dimensiones de las motoneuronas para Portillo y Pásaro (1988) son un diámetro 15 a 25 μm . El diámetro medio medido en las neuronas marcadas en los experimentos de Furusawa y colaboradores (1996) fue de 20 μm . En trabajos sobre el análisis ultraestructural de las neuronas laríngeas se ofrecen datos adicionales, así, el trabajo de Saxon y colaboradores (1996), realizado en la rata, analiza las neuronas de la formación semicompacta, donde se localizan las motoneuronas del músculo cricotiroido, de 38 μm de diámetro mayor y de 29 μm de eje menor. Estos resultados son los más similares a los nuestros, y diferentes a los medidos por Hayakawa y colaboradores (1999) para la rata, donde el tamaño medio ha sido estimado en 47,7 μm de eje mayor por 28 μm de eje menor.

Así pues, como hemos visto, la distribución de las motoneuronas que inervan, a través del nervio laríngeo superior, el músculo cricotiroido en la rata se sitúan en la porción más rostral del núcleo ambiguo, como era de esperar a la vista de los resultados de los trabajos previos de otros grupos de investigación.

5.2.- MÚSCULO CRICOARITENOIDEO POSTERIOR

De los tres músculos estudiados en este trabajo, la inyección de trazador sobre el cricoaritenideo posterior resultó ser la más complicada desde el punto de vista quirúrgico. Tras probar varios métodos, se consiguió al fin un procedimiento normalizado para el trazado de este músculo que permitió obtener resultados reproducibles de manera consistente, como se ha descrito en el capítulo de material y métodos.

NÚMERO DE NEURONAS

En nuestro trabajo hemos obtenido un número medio de neuronas trazadas de 39 ± 11 . Es un número considerablemente inferior al citado por el resto de los autores estudiados (Hinrichsen y Ryan, 1981; Portillo y Pásaro, 1988; Pásaro y cols., 1981; Bieger y Hopkins, 1987). Sin embargo, creemos que puede resultar un número bastante próximo al real en la rata. Consultando en la literatura, el marcaje de este músculo ha requerido protocolos más o menos complicados debido a la alta posibilidad de trazado no deseado de estructuras anejas. Así, diversos autores han optado por seccionar el nervio laríngeo recurrente contralateral (Pásaro y cols., 1981) o los nervios laríngeo superior ipsilateral y rama cervical del nervio vago contralateral (Berkovitz y cols., 1999). La aplicación de diferente metodología para el marcaje de este músculo es una muestra de las dificultades que ha supuesto su trazado para todos los grupos de investigadores. En la tabla 5.2.1 aparecen resumidos los resultados obtenidos por otros autores comparados con los nuestros.

AUTORES	ANIMAL	METODOLOGÍA	NÚMERO DE NEURONAS	IPSILATERAL O BILATERAL	POSICIÓN ROSTRO-CAUDAL *	MORFOMETRÍA **
Szentágothai, 1943	Perro	Electroestimulación		IPSILATERAL	r 4,0 c 2,0	
Gacek, 1975	Gato	HRP	rf 9-103 na 9-127	IPSILATERAL	Núcleo retrofacial rostral y ambiguo caudal	
Kalia y Mesulam, 1980	Gato	HRP		IPSILATERAL	Núcleo ambiguo	40-50
Hinrichsen y Ryan, 1981	Rata	HRP	17-78	IPSILATERAL	Núcleo ambiguo en posición caudal al óbex mayoritariamente	2 tamaños distintos
Schweizer y col., 1981	Murciélago	HRP		IPSILATERAL	Núcleo ambiguo en posición ventral	15
Yoshida y col., 1982	Gato	HRP		IPSILATERAL	Caudal a CT	
Portillo y Pásaro, 1988	Rata	HRP y True Blue ó Diamino Yellow	30 (HRP) 90 (DY ó TB)	IPSILATERAL	r 0 c 2,0	115-25 141 ± 7,7 a 30,2 ± 6,4 ☆
Saxon et al, 1996	Rata	HRP-WGA			r 2,0 ± 0,2 c 0,2 ± 0,2 ‡ r 1,8 c 0,9 †	
Berkowitz et al, 1999	Sprague Dawley	CTβ y estimulación antidrómica	175	IPSILATERAL		133 a 22
Hayakawa et al, 1999	Rata Sprague Dawley	CTβ				145,9 ± 1,6 a 29,4 ± 1,0\$ 151,6 ± 3,1 a 29,7 ± 1,7 ▲
NOSOTROS	Rata Sprague Dawley	CTβ	39 ± 11	IPSILATERAL	c 0,9 r 2,0	129 ± 5 a 20 ± 3

Tabla 5.2.1. Resultados de los estudios de la inervación del músculo cricoaritenideo posterior. Comparación entre autores

Abreviaturas, r: rostral; c: caudal; l: largo; a: ancho; na: núcleo ambiguo; rf: núcleo retrofacial; CT: cricotiroides; DY: diamino amarillo; TB: true blue; HRP: peroxidasa de rábano picante; CTβ: subunidad β de la toxina colérica.

* en mm; ** en μm; ‡ Retrotraído; † Estimulación antidrómica; ☆ Tamaño estimado para toda la formación laxa; \$Tipo I; ▲ Tipo II

En los experimentos realizados en gato joven (Gacek, 1975) se contabilizó un número de neuronas entre 9 y 127 en el núcleo ambiguo y de entre 9 y 103 en el núcleo retrofacial. Todos los marcajes son ipsilaterales excepto en uno de los animales intervenidos donde también aparecieron marcadas neuronas contralaterales, explicadas por el propio autor como un exceso de trazador que marcó el cricoaritenideo posterior contralateral.

En los trabajos de rata comparables a los nuestros existen diferencias según los autores. Hinrichsen y Ryan (1981), inyectando directamente HRP en el músculo obtienen un marcaje de entre 17 y 78 neuronas, que es un resultado comparable al obtenido en nuestros experimentos. Sin embargo, en algunos de los animales intervenidos, obtuvieron un número superior a 100 neuronas marcadas en el núcleo ambiguo. En el trabajo de Portillo y Pásaro (1981) se determinó un número medio de neuronas para toda la musculatura laríngea de 274; de las que se contabilizaron las neuronas marcadas para el músculo cricoaritenideo posterior como 30 para el trazador HRP y en torno a 90 neuronas para los trazadores solubles en agua Diamino Yellow (DY) ó True Blue (TB). El primer número es similar al obtenido en nuestras series experimentales mientras que el segundo resulta demasiado alto. En el mencionado artículo los autores no explican la razón para esta discrepancia, pero podría ser debida a que la naturaleza concreta de esos trazadores, DY ó TB difunden más a otras estructuras. Igual circunstancia es explicable en los ensayos de Berkowitz (1999), en los que se estimó un número de 175 neuronas para este músculo, y cuya distribución no fue explicada.

El número de neuronas en nuestros experimentos es similar entre nuestras distintas series experimentales y resulta justificable si lo comparamos con los trabajos realizados trazando los nervios laríngeos. Así Bieger y Hopkins (1987) contabilizan 140

neuronas para la formación laxa del núcleo ambiguo, donde se localizan las neuronas laringomotoras a excepción de las del músculo cricotiroides. Las neuronas de la formación laxa conducen sus axones a través del nervio laríngeo recurrente y es el origen real de la inervación de los músculos interaritenoides, cricoaritenoides lateral, tiroaritenoides y cricoaritenoides posterior. Por otra parte, trabajos previos en el trazado de los nervios laríngeos mediante dextranos biotinados muestran un resultado similar a los nuestros en el número de neuronas trazadas, 159 neuronas (Pascual-Font y cols., 2006 a y b).

Basándonos en estos datos de trazado de Bieger y Hopkins (1987) y de Pascual-Font y colaboradores (Pascual-Font y cols., 2006 a y b), la inervación del músculo cricoaritenoides posterior no puede tener un número superior de neuronas que las descritas para todo el nervio laríngeo recurrente como parecen afirmar Portillo y Pásaro (1981). Además tampoco resulta razonable que la mayoría de los axones incluidos en el nervio laríngeo recurrente pertenezcan a las motoneuronas del músculo cricoaritenoides posterior (39 motoneuronas) cuando nuestros resultados en el marcaje de el músculo tiroaritenoides (33 motoneuronas) lo desmienten.

Por otra parte, existe una cierta controversia acerca de la existencia de proyecciones bilaterales para este músculo. Mientras unos defienden su existencia (Pásaro y cols., 1981; Lobera y cols., 1981), otros no pueden determinar la presencia de un marcaje contralateral (Berkowitz y col. 1999). En nuestras series experimentales normalizadas no hay constancia de la existencia de un trazado bilateral. La descripción por parte de algunos de la existencia de estas proyecciones puede ser explicada por la contaminación accidental del trazador. En la rata, los músculos cricoaritenoides posterior de ambos lados se encuentran muy próximos. Ya que es preciso rotar la laringe para realizar la inyección del trazador, si no se actúa con extremo cuidado

resulta muy sencillo que una pequeña cantidad de la sustancia empleada llegue al músculo cricoaritenideo lateral. Esto ocurre especialmente con la HRP, que debido a su naturaleza resulta más difícil de manipular que la toxina colérica.

POSICIÓN DENTRO DEL NÚCLEO AMBIGUO

En cuanto a la posición de las motoneuronas del músculo cricoaritenideo posterior, en nuestro trabajo hemos determinado que la población abarca desde aproximadamente 0,9 mm hasta 2 mm, ambas medidas rostrales al óbex. De acuerdo a nuestros resultados se observa una concentración del 50% de las neuronas en una franja de 350 μm y, el resto de ella, más dispersa rostral y caudalmente a esa posición. Nuevamente nuestros datos resultan similares cuando se comparan con los descritos por Szentagothai (1943) y Hinrichsen y Ryan (1981), y diferentes a los descritos por Gacek (1975) y Yoshida y colaboradores (1982).

Gacek (1975) identifica las motoneuronas que inervan el músculo cricoaritenideo posterior en el núcleo retrofacial y en la columna ventral del ambiguo caudal. Algunas neuronas del núcleo retrofacial se situarían cerca de la formación reticular, explicado por su relación con los movimientos durante la respiración (Gacek, 1975). Sin embargo, Yoshida y colaboradores (1982) describen una organización radicalmente distinta, donde las motoneuronas del músculo cricoaritenideo posterior estarían en posición mucho más caudal sin apenas solapamiento con los somas de las neuronas del músculo cricotiroideo.

En la rata, Bieger y Hopkins (1987) describen la situación de las motoneuronas laríngeas que se organizan a lo largo de la formación laxa entre 1,5 mm caudalmente al

óbex hasta el propio óbex. Esta organización resulta diferente a la observada por nosotros donde el músculo tiroaritenosoide y sobre todo el músculo cricoaritenosoide posterior se ubican rostralmente al óbex. Para Portillo y Pásaro (1988) la distribución de las neuronas se extendería rostralmente al óbex hasta el polo caudal del núcleo motor del facial, solapando toda su población con las motoneuronas del músculo cricotiroideo y las del músculo tiroaritenosoide, cuyas motoneuronas se hayan dispersas a lo largo de todo el núcleo ambiguo. En el trabajo de Berkowitz y colaboradores (1999) los resultados de los experimentos de trazado realizados en rata divergen de los nuestros en que es más amplia la distribución de las neuronas para este músculo. Sin embargo, en una segunda parte de su trabajo que emplea técnicas electrofisiológicas sus datos de localización de la subpoblación de las neuronas que inervan este músculo (de 0,9 a 1,8 mm) resultan más que similares a los obtenidos por nosotros (de 0,9 a 1,9 mm).

MORFOMETRIA

El tamaño medio de las neuronas trazadas en nuestros experimentos ha sido de $29 \pm 5 \mu\text{m}$ para el diámetro mayor y $20 \pm 3 \mu\text{m}$ para el diámetro menor. En los resultados obtenidos por Portillo y Pásaro (1988) el diámetro de las neuronas trazadas, en un intervalo de entre 15 y 25 μm , es muy similar al nuestro, así como en el trabajo de Berkowitz y colaboradores (1999) que obtuvieron unas medidas entorno a los 33 μm de eje mayor y 22 μm de eje menor. Sin embargo en el trabajo de Saxon y colaboradores (1996) el tamaño es de 41 μm por 30 μm . En el trabajo de Hayakawa y colaboradores (1999) clasifican la población de motoneuronas para el cricoaritenosoide posterior en dos tipos donde el tamaño es 46 μm por 29 μm para el primer tipo y 52 μm por 30 μm . En este trabajo han trazado el músculo con toxina colérica conjugada a HRP y ninguno de los tipos que ellos describen es superponible en tamaño a los

resultados que hemos obtenido nosotros. Aunque no era el objetivo de su trabajo, hubiera sido deseable que hubiesen determinado el número y posición de las motoneuronas laríngeas. No se puede descartar que algunas de las motoneuronas identificadas mediante la inyección de trazador en el músculo cricoaritenideo posterior no correspondan en realidad con las motoneuronas del esófago contaminadas accidentalmente. Por otra parte, en los trabajos de ultraestructura y sinaptología de Hopkins y Saxon y colaboradores (Hopkins, 1995; Saxon y cols., 1996) los resultados obtenidos no pueden ser utilizados para discriminar neuronas de la formación laxa (cricoaritenideo posterior) de las hipotéticas neuronas de la formación compacta (esofágicas) del trabajo de Hayawaka (Hayawaka y cols., 1999) porque, aunque sí se han observado diferencias en la sinaptología, los resultados de los trabajos son tan divergentes que resulta inviable discriminar la naturaleza de los somas de este modo. En el trabajo de Saxon y colaboradores (1996) también se contabilizaron pequeñas neuronas de 15 por 5 μm que podrían ser interneuronas de otros núcleos, neuronas autónomas preganglionares o gamma motoneuronas.

En nuestro trabajo se optó por aislar el esófago de la laringe, ya que en varias intervenciones anteriores comprobamos que la toxina colérica podía ser captada por las fibras musculares de este órgano. Como está descrito en trabajos anteriores (Bieger y Hopkins, 1987) el esófago tiene representación en el núcleo ambiguo, siendo sus neuronas las rostrales de la formación compacta. De este modo, un marcaje accidental de las motoneuronas de este órgano obtiene como resultado subpoblaciones en distintos lugares y con tamaño distinto de neuronas de las marcadas por el músculo cricoaritenideo posterior. Si se observan los trabajos registrados en la literatura científica se puede leer que el número de neuronas marcadas desde el músculo cricoaritenideo posterior es considerablemente mayor que el nuestro. Tras un análisis reflexivo, considero que el diseño experimental de estos trabajos anteriores ha pasado por alto la representación de las fibras del esófago y que, debido a una contaminación

accidental, han contabilizado estas motoneuronas como las responsables de la inervación del músculo cricoaritenideo posterior.

5.3.- MÚSCULO TIROARITENOIDEO

ASPECTOS TÉCNICOS

Existen dos dificultades relacionadas con la inyección de toxina colérica en este músculo. Una de ellas es que la rotura de algún vaso puede conducir a la difusión del trazador contaminando otros músculos. La otra dificultad deriva de la propia técnica de inyección, puesto que, si no se presta especial cuidado, se puede diseminar el trazador hasta alcanzar el músculo cricoaritenideo lateral accidentalmente. Este hecho podría provocar la presencia de una subpoblación de neuronas trazadas supuestamente para el músculo tiroaritenideo muy amplia y dispersa a lo largo del núcleo ambiguo.

NÚMERO DE NEURONAS

En nuestros experimentos, la inyección de este músculo ha arrojado un resultado medio de 39 ± 11 motoneuronas trazadas por músculo. En el gato fueron contabilizadas entre 54 y 182 neuronas en el núcleo ambiguo y desde ninguna a 44 en el núcleo retrofacial, todas ellas en posición ipsilateral (Gacek, 1975). El trazado realizado en la rata por Hinrichsen y Ryan (1981) arroja un resultado de 31 neuronas pero en combinación con el músculo cricoaritenideo lateral. Por otra parte, el número de neuronas trazadas únicamente desde el músculo tiroaritenideo se encontraba entre 28 y 76 (Portillo y Pásaro, 1988), resultado de nuevo similar al descrito por nosotros (tabla 5.3.1).

AUTORES	ANIMAL	METODOLOGÍA	NÚMERO DE NEURONAS	IPSILATERAL O BILATERAL	POSICIÓN ROSTRO-CAUDAL *	MORFOMETRÍA **
Szentágothai, 1943	Perro	Electroestimulación		IPSILATERAL	r 3,0 c 2,0	
Gacek, 1975	Gato	HRP	r 0-44 na 54-182	IPSILATERAL	Núcleo retrofacial rostral y ambiguo caudal	
Kalia y Mesulam, 1980 b	Gato	HRP		IPSILATERAL	Núcleo ambiguo	40-50
Himrichsen y Ryan, 1981	Rata	HRP	31	IPSILATERAL	Núcleo ambiguo en posición caudal al óbex mayoritariamente	2 tamaños distintos
Schweizer y col., 1981	Murcielago	HRP		IPSILATERAL	Núcleo ambiguo en posición ventral	20
Yoshida y col., 1982	Gato	HRP		IPSILATERAL	En el núcleo ambiguo en posición caudal	
Portillo y Pásaro, 1988	Rata	True Blue y Diamino Yellow	38 (TB) 52 (DY)	IPSILATERAL	r 1,3 c -1,5	l 25-30
Saxon et al, 1996	Rata	HRP-WGA		IPSILATERAL		l 41,7 ± 7,7 a 30,2 ± 6,4 ‡
NOSOTROS	Rata Sprague Dawley	CTb	32,9 ± 11,8	IPSILATERAL	r 0,8 c -0,3	l 32,84 ± 6,30 a 22,49 ± 3,35

Tabla 5.3.1. Somatotopía del músculo tiroaritennoideo. Comparación entre autores

Abreviaturas, r: rostral; c: caudal; l: largo; a; ancho; na: núcleo ambiguo; rf: núcleo retrofacial; DY: diamino yellow; TB: true blue; HRP: peroxidasa de rábano picante; CTb: subunidad β de la toxina colérica.

* en mm; ** en μm; ‡ Tamaño estimado para toda la formación laxa

POSICIÓN DENTRO DEL NÚCLEO AMBIGUO

En nuestras series experimentales la localización de la subpoblación neuronal para el músculo tiroaritenoides se encuentra entre 0,3 mm caudal al óbex y 0,8 mm rostral a él. El 50% de las neuronas trazadas se encuentra concentrado en una pequeña franja de 350 μm de longitud, rostral al óbex, desde 19 μm hasta 369 μm .

En el gato, Gacek (1975) determina la distribución de las motoneuronas para este músculo en el núcleo ambiguo con algunas de ellas en el núcleo retrofacial, mientras que Yoshida y colaboradores (1982) describen la localización de las neuronas de este músculo caudales a las trazadas para el músculo cricotiroideo, lo que resulta más concordante con nuestros datos.

Cómo hemos visto anteriormente, Bieger y Hopkins (1987) describen la situación de las motoneuronas laríngeas que se organizan a lo largo de la formación laxa entre 1,5 mm caudalmente al óbex hasta el propio óbex. Esta organización resulta diferente a la observada por nosotros donde el músculo tiroaritenoides se ubica en su mayor parte, rostralmente al óbex. Para Portillo y Pásaro (1988) las motoneuronas del músculo tiroaritenoides se hayan dispersas a lo largo de todo el núcleo ambiguo.

Para la rata, la distribución de las motoneuronas de este músculo es diferente a la obtenida de nuestros experimentos según los diferentes autores consultados (Hinrichsen y Ryan, 1981; Portillo y Pásaro, 1981). De acuerdo a estos autores, el músculo tiroaritenoides se encuentra situado longitudinalmente, y de manera

dispersa, a lo largo de una gran extensión del núcleo ambiguo desde 1,5 mm caudal al óbex hasta 1,3 mm rostral a éste, solapando estas neuronas con las motoneuronas del músculo cricoaritenideo lateral, cricoaritenideo posterior y cricotiroideo (Portillo y Pásaro, 1988). Por lo tanto, para estos autores, el músculo no presenta un claro núcleo de motoneuronas sino que presenta una amplia dispersión de las mismas a lo largo de la columna del NA, y hay que atribuir estos resultados, a diferencia de los nuestros a dos hechos fundamentales, por un lado la cuidadosa disección quirúrgica, evitando en todo momento la contaminación de otros grupos musculares con el trazador, que hemos realizado, como hemos explicado en el capítulo de Material y Métodos y por otro a las propias características del trazador que hemos usado, que hacen que en su manipulación podamos ser más precisos y evitemos marcar otros músculos.

MORFOMETRIA

El tamaño de medio de las neuronas medido por Portillo y Pásaro (1988) fue de 25 a 30 μm de diámetro, muy similar al descrito por nosotros donde la media del diámetro mayor es de $33 \pm 6 \mu\text{m}$ y el diámetro menor de $22 \pm 3 \mu\text{m}$.

5.4.- SOLAPAMIENTO DE LOS TERRITORIOS DE LAS POBLACIONES NEURONALES

SOLAPAMIENTO DE LAS POBLACIONES NEURONALES DE LOS MÚSCULOS CRICOTIROIDEO Y CRICOARITENOIDEO POSTERIOR

El área de solapamiento de las motoneuronas de estos dos músculos en el núcleo ambiguo está sujeta en la literatura a diferentes interpretaciones. Mientras para un gran número de autores, con trabajos desarrollados en diferentes especies de animales, estas dos subpoblaciones solapan en una amplia región rostrocaudal (Szentagothai, 1943; Gacek, 1975; Schweizer y cols., 1981; Portillo y Pásaro, 1988; Pascual-Font y cols., 2006ab), para otros autores el solapamiento se reduce a una pequeña región (Yoshida y cols., 1982). Por último, para otros autores, estas dos subpoblaciones no sólo no solapan sino que están separadas por un espacio entre ambas (Bieger y Hopkins, 1987; Patrickson y col, 1991).

Nuestra interpretación coincide con la descrita por Szentagothai (1943). Nuestros datos provenientes de la inyección de trazador en los dos músculos confirman que la región de solapamiento entre el nervio laríngeo superior y nervio laríngeo recurrente es muy similar al solapamiento de los músculos cricotiroideo y cricoaritenoideo posterior (Pascual-Font y cols., 2011).

SOLAPAMIENTO DE LAS POBLACIONES NEURONALES DE LOS MÚSCULOS CRICOTIROIDEO Y TIROARITENOIDEO

Como resulta esperable por los resultados obtenidos, no es posible ver ninguna región de solapamiento entre las subpoblaciones de estos dos músculos. Entre ambas agrupaciones neuronales hay una distancia de 700 μm en la que, en ningún caso, hemos encontrado ninguna neurona trazada.

SOLAPAMIENTO DE LAS POBLACIONES NEURONALES DE LOS MÚSCULOS TIROARITENOIDEO Y CRICOARITENOIDEO POSTERIOR

En los experimentos realizados en perro de electroestimulación y lesión de los territorios del núcleo ambiguo que inervan estos dos músculos laríngeos, se determinó que existe una gran región donde solapan estas dos subpoblaciones de motoneuronas (Szentagothai, 1943). Para Gacek (1975), sin embargo, en su trabajo realizado en gatos, la población neuronal para el músculo cricoaritenoideo posterior se encuentra en la formación dorsal del núcleo ambiguo mientras que la correspondiente al músculo tiroaritenoideo se localiza en la formación ventral, compartiendo ambas poblaciones la misma región longitudinal pero sin entremezclarse los mismos por ocupar distintas posiciones en el eje dorsoventral de la médula oblongada (Gacek, 1975). Contrariamente, en un trabajo que utiliza el mismo modelo animal y la misma metodología, estos dos músculos comparten un amplio territorio de solapamiento rostrocaudal (Yoshida y cols., 1982).

En el artículo de Hinrichsen y Ryan (1981) estas dos subpoblaciones solapan en un amplio intervalo. En el trabajo de Bieger y Hopkins (1987) no se analizan por separado

las poblaciones neuronales correspondientes a los músculos cuyos axones son conducidos a través del nervio laríngeo recurrente, estableciéndose que todos los somas de las neuronas laringomotoras se localizan en la formación laxa entre el óbex y 1,5 mm caudal al mismo.

Otros autores, en cambio, sí han tratado de establecer la organización territorial de las neuronas de estos músculos en el núcleo ambiguo y han descrito una región de solapamiento entre el músculo cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo que puede tratarse de una región común (Szentagothai, 1943).

De acuerdo a nuestras observaciones, la interpretación de los datos difiere de la ofrecida por la mayoría de los autores citados (Szentagothai, 1943; Gacek, 1975; Hinrichsen y Ryan, 1981; Schweizer y cols., 1981; Portillo y Pásaro, 1988) porque la región donde estas dos subpoblaciones coinciden es de apenas 70 μm . También nuestros resultados niegan la interpretación de Gacek (1975), ya que no hemos identificado las dos divisiones dorsal y ventral en las que clasifica el núcleo ambiguo.

En nuestros experimentos de trazado de los tres músculos laríngeos elegidos, hemos establecido una distribución somatotópica precisa de las neuronas de cada uno de ellos. En trabajos anteriores, algunos autores trataron de determinar la distribución rostrocaudal pero ya sea por el modelo de estudio empleado, la metodología utilizada, o por tener un objetivo diferente al buscado por nuestro trabajo, la representación topográfica no ha sido todo lo ajustada de lo que hubiese sido deseado (Hinrichsen y Ryan, 1981; Portillo y Pásaro, 1988; Pásaro y cols., 1981; Bieger y Hopkins, 1987). Esto puede ser debido en parte a la naturaleza del trazador empleado. La toxina colérica empleada por nosotros ha demostrado ser, comparativamente, un trazador más

sensible y fiable que la clásica HRP (Dederen y cols., 1994, Vercelli y cols., 2000). Es razonable pensar que, en un futuro, se logren sintetizar trazadores aún más fiables y que se elaboren protocolos que permitan determinar la somatotopía de cada músculo de manera mucho más exacta.

Por otra parte, el empleo de los nervios vestibulococleares como referencia para elaborar un factor de compensación en la determinación de la posición exacta de cada neurona, al minimizar las desviaciones que se puedan producir por la desviación del plano de sección transversal, contribuye, sin ningún género de duda, a determinar más ajustadamente la posición de las motoneuronas dentro del núcleo ambiguo. De este modo, podemos establecer fielmente la posición de las neuronas motoras de los músculos intrínsecos laríngeos con una desviación típica de menos 200 μm , lo que supone una evolución importante desde los primeros trabajos de Szentagothai (1943) hasta hoy.

Respecto al análisis estadístico de los resultados, las diferencias entre las distancias entre la ubicación en el tronco cerebral de las tres poblaciones neuronales correspondientes a cada uno de los músculos son inequívoca y estadísticamente significativas. Este análisis se ha realizado mediante un análisis de la varianza (ANOVA por pasos) gracias a el paquete informático STATISTICA 6.0 y esta significación se expresa desde el punto de vista estadístico como

- STEPWISE ANOVA $F_{2,2436}=698.52$; $P<0.0001$.

Como podría ser que estas diferencias significativas fueran debidas a que la distancia de alguna de ellas por separado enmascarase las distancias del resto, se hace la comparación por pares y se han encontrado diferencias significativas al comparar las

distancias de inserción de entre cada una de las poblaciones neuronales (todas las $P < 0.05$) (LSMEANS, estima = 1557.49 ± 24.29 , $t = -64.11$; estima = 1479.07 ± 26.33 ; estima = 227.82 ± 29.72 respectivamente para los músculos cricotiroidoideo, cricoaritenoidoideo posterior y tiroaritenoidoideo).

El significado funcional de la organización topográfica del núcleo ambiguo sigue siendo motivo de especulación, pero es claro que el control de los ciclos de respiración de la laringe, el proceso de fonación y los reflejos laríngeos requiere una coordinación central y periférica exquisita (Wyke y Kirchner, 1976; Sasaki, 2006; McHanwell, 2008). Por lo tanto, este solapamiento rostrocaudal en la ordenación neuronal podría reflejar el sustrato anatómico para esa coordinación, como otros autores ya han sugerido (Wetzel y cols. 1980; Hinrichsen y Ryan, 1981; Davis y Nail, 1984; Bieger y Hopkins, 1987; Patrickson y cols. 1991; Pascual-Font y cols. 2011)

6.- CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

El presente estudio pone de manifiesto las siguientes conclusiones:

1. Las motoneuronas de los músculos intrínsecos de la laringe presentan una disposición rostrocaudal en el núcleo ambiguo.
2. La disposición rostrocaudal de las motoneuronas de los tres músculos que hemos estudiado es la siguiente: el músculo cricotiroideo es el más rostral, seguido caudalmente del músculo cricoaritenideo posterior y por el músculo tiroaritenideo, situado en posición más caudal.
3. La localización de las motoneuronas de cada músculo estudiado presenta una localización somatotópica específica en el núcleo ambiguo, puesto que las agrupaciones de somas neurales conservan la posición de un animal a otro.
4. El número medio de somas neuronales que inerva cada uno de los músculos estudiados es homogéneo de músculo a músculo, sin grandes variaciones y se corresponde con entre 30 y 40 neuronas por músculo.
5. El 50% de las motoneuronas trazadas para cada músculo estudiado se agrupan en un pequeño territorio de unos 400 micrómetros de longitud.
6. Se producen áreas de solapamiento entre las poblaciones de las motoneuronas del músculo cricotiroideo y del músculo cricoaritenideo posterior y del músculo cricoaritenideo posterior y tiroaritenideo. No existe ninguna región de solapamiento entre el músculo cricotiroideo y el músculo tiroaritenideo.
7. Las motoneuronas trazadas que inervan los tres músculos estudiados son de morfología multipolar, con un tamaño medio de unos 30 μm en su eje mayor y 20 μm en su eje menor.

7.- BIBLIOGRAFIA

7.- BIBLIOGRAFIA

ALFEWSKY (1905) Citado por Molhant M 1912.

AVELLANEDA R (2000) *Las vías aerodigestivas superiores y el oído en la Evolución de las especies*. Glosa Ediciones , Barcelona.

ARVEDSON JC, ROGERS BT (1998) *Dysphagia in children*. En: Johnson AF, Jacobson BH, editores. *Medical speech-language pathology. A practitioner's guide*. Thieme Medical Publishers. Nueva York, Stuttgart

BANNISTER LH (1995) *Respiratory system*. En *Gray's Anatomy* 38ª edición. Churchill Livingstone, 1627-1682. Londres

BARAZZONI AM, CLAVENZANI P, CHIOCCHETTI R, AVONI BOMPADRE G, GRANDIS A, PETROSINO G, LALATTA COSTERBOSA G, BORTOLAMI R (2005) Localization of recurrent laryngeal nerve motoneurons in the sheep by means of retrograde fluorescent labelling. *Res Veterinary Science* 78: 249-253.

BARBAS-HENRY HA, LOHMAN AH (1988) The motor nuclei and sensory neurons of the IIIrd, IVth, and VIth cranial nerves in the monitor lizard, *Varanus exanthematicus*. *J Comp Neurol* 15;267(3):370-8.

BASTERRA J, CHUMBLEY C, DILLY N (1987) Topographic distribution of laryngeal motor neurons in the nucleus ambiguus of the Guinea pig studied by horseradish peroxidase (HRP) technique. *Acta Otolaryngol* 103: 105-110.

BERKOWITZ RG, SUN QJ, CHALMERS J, PILOWSKY P (1999) Intracellular recording from posterior cricoarytenoid motoneurons in the rat. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 108(12):1120-1125.

BIEGER D, HOPKINS DA (1987) Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the medulla oblongata in the rat: the nucleus ambiguus. *J Comp Neurol* 22;262(4):546-562.

BERKOWITZ R G, SUN Q-J, CHALMERS J, PILOWSKY P M (1999) Intracellular recording from posterior cricoarytenoid motoneurons in the rat. *Annals of Otolology, Rhinology, and Laryngology* 108:1120-1125.

BERMÚDEZ DE ALVEAR R (2000) *Perfil de uso vocal en el profesorado de los colegios públicos de Málaga*. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga.

BIANCHONI R, RASCHI F (1964) Respiratory control of the motoneurons of the recurrent laryngeal nerve and hypocapnic apnoea. *Arch Ital Biol* 102:56.

BLITZER A, BRIN, MF, RAMIG, LO (2009). *Neurologic disorders of the larynx*. Second Edition. Thieme, Nueva York.

BOURDIAL J, NATALI R. L'EPIGLOTE (1954) Anatomie descriptive, topographique et chirurgicale. *Annales d'Otolaryngologie*, 81,9:529-54.

BRODAL A (1981) *Neurological anatomy in relation to clinical medicine*. Oxford University Press, New York.

BUNZL-FEDERN 1899. Citado por Lawn 1966a.

CABEZUDO L (1988) *Anatomía, fisiología y exploración clínica de la laringe*. En: Martínez Vidal A, Bertrán Mendizábal JM, cabezudo García L, Cobeta Marco I. *Otorrinolaringología Básica*. Ediciones Ergón.p.289-302. Madrid.

CHANAUD CM, LUDLOW CL (1992) Single motor unit activity of human intrinsic laryngeal muscles during respiration. *Ann Otol Rhinol* 102:832-40.

CIGES M (1973) *Discurso de recepción en la Real Academia de Medicina de Granada*. Gráficas del Sur, S.A. Granada.

CIGES M, FERNÁNDEZ CERVILLA F (1998) *Anatomía, fisiología y embriología de la laringe. Exploración*. En: Ramírez Camacho R, editor. *Manual de Otorrinolaringología*. McGraw-Hill-Interamericana de España p.313-26. Madrid.

CONTE WL, KAMISHINA H, REEP RL (2009) Multiple neuroanatomical tract-tracing using fluorescent Alexa Fluor conjugates of cholera toxin subunit B in rats. *Nat Proto*,. 4: 1157-1166.

CRAGO PE, PECKHAM PH, KILGORE K, TILLS K, THROPE GB (1986) Coordination and cocontraction in open and closed loop control of grasp through functional neuromuscular stimulation. *Soc Neurosci* 12:1307.

DARWIN, CHARLES (1859) *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life* (1st ed.). John Murray (ed.). London.

DAVIS PJ, NAIL BS (1984) On the location and size of laryngeal motoneurons in the cat and rabbit. *J Comp Neurol* 230: 13-32.

DEDEREN PJ, GRIBNAU AA, CURFS MH (1994) Retrograde neuronal tracing with cholera toxin B subunit: comparison of three different visualization methods. *Histochem J*. 26(11):856-62.

DEJONCKERE P (1981) *Théorie oscillo-impédantielle de la vibration des cordes vocales* [Thèse d'Agrégation de l'Enseignement Supérieur]. Université Catholique de Louvaine.

FINK BR (1956) The mechanism of closure in human larynx. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 60:117-27.

FINK BR (1962) Adaptations for phonatory efficiency in the human vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 71:79-85.

FINK BR, DEMAREST RJ (1978) *Laryngeal biomechanics*. Harvard University Press , Cambridge, Massachusets.

FLINT PW, DOWNS DH, COLTRERA MD (1991) Laryngeal synkinesis following reinnervation en the rat. Neuroanatomic and physiologic study using retrograde fluorescent tracers and electromyography. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 100: 797-806.

FORD CN, BLESS DM (1991) *Phonosurgery: assessment and surgical management*. Raven Press Nueva York.

FRIED MP (1988) *The Larynx. A multidisciplinary approach*. Little, Brown and Company, Boston.

FRIEDMAN I, FERLITO A (1988) *Granulomas and neoplams of the larynx*. Churchill Livingstone.

FURUSAWA K, YASUDA K, OKUDA D, TANAKA M, YAMAOKA M (1996) Central distribution and peripheral functional properties of afferent and efferent components of the superior laryngeal nerve: morphological and electrophysiological studies in the rat. *J Comp Neurol*, 375: 147-156.

FANT G, LILJENCRANTS J (1985) A four parameter model of the glottal flow. *STL-QPSR*, 26: 4, 1-13.

GACEK, MD (1975) Localization of laryngeal motor neurons in the kitten. *Laryngoscope* 85: 1841-1860.

GETZ Y SIRNES (1949) Citado por Kalia y Mesulam 1980a.

HAINES DE (2003) *Principios de Neurociencia*. Elsevier Science, Madrid.

HAMILTON WJ, BOYD JD, MOSSMAN HW (1962) *Human embryology (prenatal development of form and function)*. Tercera edición. W. Heffet and Sousltd. Cambridge, Inglaterra

HAMILTON RB, NORGREN R (1984) Central projections of gustatory nerves in the rat. *J Comp Neurol*. 1;222(4):560-77.

HANAFAE WN (1990) *The larynx*. Thieme Medical Publisher, Nueva York.

HANAMORI T, SMITH DV (1989) Gustatory innervation in the rabbit: central distribution of sensory and motor components of the chorda tympani, glossopharyngeal, and superior laryngeal nerves. *J Comp Neurol* 282: 1-14.

HAST MH (1972) Early development of the human laryngeal muscles. *Ann Otol* 81:524-31.

HAST M (1978) *Anatomy of the larynx*. En: English GM, editor. *Otolaryngology* .Vol.III.: Harper & Row. Philadelphia

HAYAKAWA T, ZHENG JQ, MAEDA S, ITO H, SEKI M, YAJIMA Y (1999) Synaptology and ultrastructural characteristics of laryngeal cricothyroid and posterior cricoarytenoid motoneurons in the nucleus ambiguus of the rat. *Anat Embryol (Berl)*, 200(3):301-311.

HINRICHTSEN CFL, RYAN T (1981) Localization of laryngeal motoneurons in the rat: morphologic evidence for dual innervation? *Exp Neurol*, 74: 341-355.

HIRANO M (1975) Phonosurgery: basic and clinical investigations. *Otologia Fukuska* 21:239-42.

HIRANO M, KAKITA Y (1985) *Cover-body theory in vocal fold vibration*. En: Daniloff RG, editor. *Speech Science*. College Hill Press;p.1-46. San Diego (CA).

HIRANO M, KURITA S, SAKAGUCHI S (1989) Ageing of the vibratory tissue of human vocal folds. *Acta Otolaryngol (Stockh)*, 107:428-33.

HISA Y, LYON MJ, MALMGREN LT (1985) Central projection of the sensory component of the rat recurrent laryngeal nerve. *Neurosci Lett* 5: 185-190.

HOPKINS DA, GOOTMAN PM, GOOTMAN N, DI RUSSO AS, ZEBALLOS ME (1984) Brainstem cells of origin of the cervical vagus and cardiopulmonary nerves in the neonatal pig. *Brain Res* 306: 63-72.

HOPKINS DA, BIEGER D, VENDE J, STEINBUSCH HWM (1996) Vagal efferent projections: viscerotopy, neurochemistry and effects of vagotomy. *Progress Brain Res* 107: 79-95.

HUDOVERING (1908) Citado por Bieger y Hopkins 1987.

ICHIKAWA T, SHIMIZU T (1998) Organization of choline acetyltransferase-containing structures in the cranial nerve motor nuclei and spinal cord of the monkey. *Brain Res* 779: 96-103.

INAGI K, SCHULTZ E, FORD CN (1998) An anatomic study of the rat larynx: establishing the rat model for neuromuscular function. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 118(1):74-81.

JORDAN D (2001) Central nervous pathways and control of the airways. *Respir Physiol*. 125(1-2):67-81.

KAHLE W (2003) *Atlas de Anatomía: Sistema Nervioso y órganos de los sentidos*. Omega, Barcelona.

KALIA M, MESULAM MM (1980 a) Brain Stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: I. The cervical vagus and nodose ganglion. *J Comp Neurol* 193: 435-465.

KALIA M, MESULAM MM (1980 b) Brain Stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: II. Laryngeal, tracheobronchial, pulmonary, cardiac and gastrointestinal branches. *J Comp Neurol* 193: 467-508

KALIA M, SULLIVAN JM (1982) Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus nerve in the rat. *J Comp Neurol* 211: 248-65.

KAPUSCINSKI J (1995) DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem.* 70(5):220-33.

KIRCHNER JA (1987) *Laryngeal reflex systems*. En: Baer T, Sasaki C, Harris K, editores. Laryngeal function in phonation and respiration. Little, Brown, Boston.

KIRCHNER JA (1994) *Fisiología de la laringe*. En: Paparella MM, Shumrick DA, Gluckman JL, Meyerhoff WL. Otorrinolaringología. Vol.I. 3ª ed.: Editorial Médica Panamericana; p.398-408. Buenos Aires

KOBLER JB, DATTA S, GOYAL RK, BENECCI EJ (1994) Innervation of the larynx, pharynx, and upper esophageal sphincter of the rat. *J Comp Neurol.* 1;349(1):129-47.

KOSAKA (1909) Citado por Bieger y Hopkins 1987.

KRAUSE (1876) Citado por Molhant M 1912.

KUNA ST, VANOYE CR (1994) Laryngeal response during forced vital capacity maneuvers in normal adult humans. *Am J Respir Crit Care Med* 150:729-34

LACAU ST. GUILY J, FARDEAU M (1983) Muscles intrinsèques du larynx de l'homme. Caractéristiques histoenzymologiques des fibres musculaires. *Ann Oto-laryng Paris* 100:1-12.

LAITMAN JT (1977) *The ontogenetic and phylogenetic development of the upper respiratory system and basicranium in man* [Tesis doctoral]. Yale University. University Microfilms Ann Arbor MI.

LAITMAN JT, REIDENBERG JS (1993) *Comparative and developmental anatomy of laryngeal position*. En: Head and neck surgery Otolaryngology. Baley BJ, Johnson JT, editors. J.B. Lippincott Company Philadelphia.

LAWN AM (1966 a) The localization, in the nucleus ambiguus of the rabbit, of the cells of origin of motor nerve fibers in the glossopharyngeal nerve and various branches of the vagus nerve by means of retrograde degeneration. *J Comp Neurol* 127: 293-306.

LAWN AM (1966 b) The nucleus ambiguus of the rabbit. *J Comp Neurol* 127: 307-320.

LEE BH, LYNN RB, LEE HS, MISELIS RR, ALTSCHULER SM (1992) Calcitonin gene-related peptide in nucleus ambiguus motoneurons in rat: viscerotopic organization. *J Comp Neurol* 320: 531-543.

LEÓN X, PUJOL A, LÓPEZ M, GARCÍA J, PONS G, SAÑUDO JR, MASIÀ J, QUER M (2008) Larynx transplant: a therapeutic option for the 21st century? Literature review. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 59(3):127-38.

LEONARD R, KENDALL K (1997) *Dysphagia assessment and treatment planning. A team approach.* Singular Publishing Group, Inc .p.9-10. San Diego.

LIEBERMAN P (1984) *The biology and evolution of language.* Harvard University Press. Cambridge.

LOBERA B, PASARO R, GONZALEZ-BARON S, DELGADO-GARCIA JM (1981) A morphological study of ambiguous nucleus motoneurons innervating the laryngeal muscles in the rat and cat. *Neurosci Lett* 23: 125-30.

MAGRIPLES U, LAITMAN JT (1987) Developmental change in the position of the fetal human larynx. *Am J Phys Anthropol* 72:463.

MALMGREN LT, GACEK RR (2009) Central laryngeal motor innervations. En : Blitzer A, Brin MF, Ramig LO (ed). *Neurological disorders of the larynx. Second Edition.* Thieme, New York

MARANILLO E, LEÓN X, QUER M, ORÚS C, SAÑUDO JR (2003) Is the external laryngeal nerve an exclusively motor nerve? The cricothyroid connection branch. *Laryngoscope*, 113(3):525-9.

MARINESCO Y PARHON (1907) Citado por Bieger y Hopkins 1987.

MCHANWELL S, BISCOE TJ (1981) The sizes of motoneurons supplying hindlimb muscles in the mouse. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 14;213(1191):201-216.

MCHANWELL S (2008) *The larynx.* In *Gray's Anatomy 40th* (ed. Standring S), pp. 577-594. Churchill Livingstone, London.

MEKALANOS JJ, SWARTZ DJ, PEARSON GD, HARFORD N, GROVNE F, DE WILDE M (1983) Cholera toxin genes; nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. *Nature*, 306: 551-557

MELLER JM (1984) Functional anatomy of the larynx. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 17:3-12.

MOLHANT M (1912) Le nerf vague. Etude anatomique et expérimentale. Deuxième partie. Le noyau ambigu ; les connexions anatomiques et la valeur fonctionnelle du noyau central du vague et du noyau ambigu. *Névrxax* 13: 9-316

MORRIS IR (1988) Functional anatomy of the upper airway. *Emerg Med Clin North Am.* 6(4):639-69.

MORRISON MD (1952) Recurrent laryngeal nerve paralysis. A revised conception based on the dissection of one hundred cadavers. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 61: 567-92.

NAHM I, SHIN T, CHIBA T (1990) Regeneration of the recurrent laryngeal nerve in the guinea pig. Reorganization of motoneurons after freezing injury. *Am J Otolaryngol* 11: 90-98.

NAIFEH KH, HUGGINS SE, HOFF HE, HUGG TW, NORTON RE (1970) Respiratory patterns in crocodilian reptiles. *Respir Physiol.* Apr;9(1):31-42.

NANCE Y COLS. (1987) Citado por Hopkins y cols. 1996.

NARCY P, ANDRIEU-GUITRANCOURT J, BEAUVILLAIN DE MONTREUIL C, DESNOS J, GARCIN M, MORGON A (1979) *Le larynx de l'enfant*. Société Française d'Oto-Rhino-Laryngologie et de Pathologie Cervico-Faciale. Librairie Arnette. Paris.

NEGUS VE (1949) The evolution of the voice of animals and man. *Ir J Med Sc,* Feb;(278):85-9.

NEGUS VE (1957) The mechanism of the larynx. *Laryngoscope* 67:961.

NOMURA S, MIZUNO NB (1983) Central distribution of efferent and afferent components of the cervical branches of the vagus nerve. A HRP study in the cat. *Anat Embryol* 166 (1): 1-18.

NOSAKA Y COLS (1979) Citado por Bieger y Hopkins 1987.

NÚÑEZ-ABADES PA, PÁSARO R, BIANCHI AL (1992) Study of the topographical distribution of different populations of motoneurons within rat's nucleus ambiguus, by means of four different fluorochromes. *Neurosci Lett,* 20;135(1):103-107

PÁSARO R, LOBERA S, GONZÁLEZ-BARÓN S, DELGADO-GARCÍA JM (1981) Localización de las motoneuronas de los músculos intrínsecos de la laringe en la rata. *Rev Esp Fisiol,* 37: 317-322

PÁSARO R, LOBERA B, GONZALEZ-BARON S, DELGADO-GARCIA JM (1983) Cytoarchitectonic organization of laryngeal motoneurons within the nucleus ambiguus of the cat. *Exp Neurol* 82: 623-634.

PASCUAL-FONT A, MERCHÁN A, MARANILLO E, BRILLAS A, SAÑUDO JR, VALDERRAMA-CANALES FJ (2006 a) Morphometry of the recurrent laryngeal nerves of the rat. *Acta Otorrinolaringol Esp*,57(10):435-40.

PASCUAL-FONT A, MARANILLO E, MERCHÁN A, VÁZQUEZ T, SAFIUDO JR, VALDERRAMA-CANALES F (2006 b) Central projections of the rat superior laryngeal nerve. *Acta Otorrinolaringol Es*, 57(7):295-9.

PASCUAL FONT A (2007) *Proyecciones centrales de los nervios laríngeos en un modelo experimental de degeneración-regeneración de rata adulta* [Tesis doctoral], Madrid, Universidad Complutense.

PASCUAL-FONT A, HERNÁNDEZ-MORATO I, MCHANWELL S, VÁZQUEZ T, MARANILLO E, SAÑUDO J, VALDERRAMA-CANALES FJ (2011) The central projections of the laryngeal nerves in the rat. *J Anat*. 219(2):217-28.

PATRICKSON JW, SMITH TE, ZHOU SS (1991) Motor neurons of the laryngeal nerves. *Anat Rec*. 230(4):551-6.

PAXINOS G, WATSON C (2005) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier Academic, Amsterdam.

PERELLÓ J (1967) Muco-ondulatory theory of the vibration of the vocal cords. *Acta Otorinolaryngol Iber Am* 18,1:7-12

PERNKOPF E (1960) *Anatomía topográfica humana. Tomo Tercero. Cuello*. Labor, Barcelona, Madrid.

PERRIN C, PERRIN PH (1985) Le cartilage cricoïde: étude anatomo-clinique et chirurgicale. *Les cahiers d'ORL*, 20,5:339-75.

PORTILLO F, PASARO R (1988) Location of motoneurons supplying the intrinsic laryngeal muscles of rats. Horseradish peroxidase and fluorescence double-labeling study. *Brain Behav Evol*, 32: 220-225.

PORTMANN G (1960) *Oto-Rhino-Laryngologie*. Tomo II. G. Doin, Paris.

POWLEY Y COLS. (1992) Citado por Hopkins y cols., 1996.

PROCTOR DF (1980) *Breathing, speech and song*. Springer-Verlag. Nueva York.

REIDENBERG JS, LAITMAN JT (1987) The position of the larynx in Odontoceti (toothed whales). *Anat Rec* 218:98.

RANSON RN, BUTLER PJ, TAYLOR EW (1995) Studies on nerves of the upper respiratory tract in the ferret (*Mustela putorius furo*) and the mink (*Mustela vison*). *J of the Autonomic Nervous System* 52: 1-16.

RAMON Y CAJAL S (1909) *Histologie du Systeme Nerveux de l'homme et des vertébrés*. Malaine, París.

ROMER AS (1963) *Man and Vertebrates*. Penguin Books. Harmondsworth.

ROUVIERE H, DELMAS A (2005) *Anatomía humana. Descriptiva, topográfica y funcional*. Tomo II, Undécima Edición. Masson, Paris.

SAKAI ST, DAVIDSON AG, BUFORD JA. (2009) Reticulospinal neurons in the pontomedullary reticular formation of the monkey (*Macaca fascicularis*). *Neuroscience*, 10;163(4):1158-1170.

SAPER CB (2000) *Brain stem, reflexive behaviour and the cranial nerves*. En Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of neural science*. 873-888. Mc Graw Hill. New York.

SAÑUDO, J R (1987) *Desarrollo de la laringe con especial referencia a la morfogénesis de la cavidad, cartílagos y sistema neuromuscular*. (Tesis Doctoral). Univ. Aut. Barcelona. Bellaterra.

SAÑUDO JR, MARANILLO E, LEÓN X, MIRAPEIX RM, ORÚS C, QUER M (1999) An anatomical study of anastomoses between the laryngeal nerves. *Laryngoscope*, 109(6):983-987.

SASAKI CT, FUKUDA H, KIRCHNER JA (1973) Laryngeal abductor activity in response to varying ventilatory resistance. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 77:403

SASAKI CT, SUZUKI M (1976) Laryngeal reflexes in cat, dog and man. *Arch Otolaryngol* 102:400.

SASAKI CT, ISAACSON G (1988) Functional anatomy of the larynx. *Otolaryngol Clin North Am*. 21(4):595-612.

SASAKI CT (2006) Anatomy and development and physiology of the larynx. [Online]. Raj Goyal and Reza Shaker: GI Motility online. Available at: <http://www.nature.com/gimo/contents/pt1/full/gimo7.html> [Accessed 19 December 2007].

SAXON DW, ROBERTSON GN, HOPKINS DA (1996) Ultrastructure and synaptology of the nucleus ambiguus in the rat: the semicompact and loose formations. *J Comp Neurol* 375: 109-27.

SEGRE R (1997) *Principios de foniatría: para alumnos y profesionales de canto y dicción*. Médica panamericana. Argentina.

SCHEWIZER H, RUEBSAMEN R, RUEHLE C (1981) Localization of brain stem motoneurons innervating the laryngeal muscles in the rufous horseshoe bat, *Rhinolophus rouxi*. *Brain Res* 230: 41-50.

SMITH G (1977) Structure of the normal rat larynx. *Laboratory Animals* 11, 223-228.

STARK D, SCHNEIDER R (1960) *Larynx*. En: Hofer H, Schultz AH, Stark D, editores. *Handbook of Primatology*. Vol. 2. Part 2. Karger. Nueva York.

SUZUKI M, KIRCHNER JA (1969) Sensory fibers in the recurrent laryngeal nerve. An electrophysiological study of some laryngeal afferent fibers in the recurrent laryngeal nerve of the cat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 78: 21-31.

SUZUKI M, KIRCHNER JA, MURAKAMI I (1970) The cricothyroid as a respiratory muscle. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 79:976.

SUZUKI M, SASAKI CT (1977 a) The effect of various sensory stimuli on reflex laryngeal adduction. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 86:30.

SUZUKI M, SASAKI CT (1977 b). Laryngeal spasm: a neurophysiologic redefinition. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 86:150.

SZENTÁGOTHAJ J (1943) Die lokalisation der kehlkopfmuskulatur in deu vaguskernen. *Zeitschrift fur Anatome und Entwicklungsgeschichte* 112: 704-710.

TITZE IR (1993) *Vocal fold physiology*. *Frontiers in basic science*. Singular Publishing Group. San Diego (CA).

TRAVERS JB, NORNGREN R (1983) Afferent projections to the oral motor nuclei in the rat. *J Comp Neurol*, 1;220(3):280-298.

TUCKER GF, SMITH HR (1962) A histological demonstration of the development of laryngeal connective tissue compartments. *Trans Am Acad Ophtalmol Otolaryngol* 66:308-318.

TUCKER GF, TUCKER JA, VIDIC B (1977) Anatomy and development of the cricoid. Serial section whole organ study of perinatal larynges. *Ann Otol* 6(86):766-69.

TUCKER HM (1993) *The larynx*. 2ª ed. Thieme Medical Publishers Nueva York.

VAN DER BERG J (1958) Myoelastic-aerodynamic theory of voice production. *J Speech Hear Res* 1:227-44.

VAN GEHUCHTEN (1898) Citado por Bieger y Hopkins 1987.

VERCELLI A, REPICI M, GARBOSSA D, GRIMALDI A (2000) Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals. *Brain Res Bull.* 1;51(1):11-28.

WETZEL DM, KELLEY DB, CAMPBELL BA (1980) Central control of ultrasonic vocalizations in neonatal rats: I. Brain stem motor nuclei. *J Comp Physiol Psychol.* 94(4):596-605.

WIND J (1970) *On the phylogeny and the ontogeny of the human larynx.* Noordhoff Publishing Co. Groningen.

WOLFSON VP, LAITMAN JT (1990) Ultrasound investigation of fetal human upper respiratory anatomy. *Anat Rec* 227:363.

WUSTROW F (1970) *Laringe. Anatomía comparada y embriología, malformaciones, anomalías y variantes.* En: Berendes J, Link R, Zölner F. Tratado de Otorrinolaringología. Tomo II/2.: Ed Científico-Médica.p.793-809. Barcelona.

WYKE B, KIRCHNER J (1976) *Neurology of the larynx.* En: Hinchcliffe R, Harrison D, eds. Scientific foundation of otolaryngology.: William Heinemann Medical Books, 546-66. London.

YAJIMA Y, HAYASHI Y (1983) Identification of motoneurons in the nucleus ambiguus by antidromic stimulation of the superior and the recurrent laryngeal nerves in rats. *Brain Res*, 12;288(1-2):302-306.

YANAGISAWA E, HAUSFELD J (1987) Larynx. En: Lee, KJ, (ed). *Essential Otolaryngology Head and Neck Surgery.* Elsevier Science Publishing, Nueva York.

YOSHIDA Y, MIYAZAKI T, HIRANO M, SHIN T, KANASEKI T (1982) Arrangement of motoneurons innervating the intrinsic laryngeal muscles of cats as demonstrated by horseradish peroxidase. *Acta Otolaryngol* 94: 329-334.

ZAW-TUN HA, BURDI AR (1985) Reexamination of the origin and early development of the human larynx. *Acta Anat (Basel)* 122:163.

ZEMLIN WR (1998) *Speech and hearing science: Anatomy and physiology (4th ed.).* Needham Heights, MA: Allyn & Bacon.