

# Proyecciones centrales del nervio laríngeo recurrente de la rata

A. Pascual-Font, E. Maranillo, A. Merchán, T. Vázquez, J.R. Sañudo, F.J. Valderrama-Canales

Departamento de Anatomía y Embriología Humana I. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

**Resumen:** Los nervios laríngeos contienen las fibras que controlan la función laríngea. Pocos y discrepantes son los estudios que se han realizado en la rata para conocer los componentes funcionales y el origen real de las fibras que componen el nervio laríngeo recurrente (NLR). En ninguno de estos estudios se ha utilizado dextranos, potentes herramientas para el trazado nervioso. El objetivo de nuestro estudio es identificar en la rata los núcleos de origen de las fibras que porta el NLR, conociendo así los componentes funcionales del mismo, mediante el trazado con dextranos biotinados (BDA). El estudio se ha realizado en 31 ratas Sprague-Dawley machos adultos, aplicando el BDA en el NLR previamente lesionado. Los resultados en todos los animales muestran que el NLR de la rata no contiene fibras aferentes, mientras que las fibras eferentes se originan en el núcleo ambiguo (NA) ipsilateral. Por lo tanto, en la rata, el NLR parece contener exclusivamente fibras eferentes, debiendo de ser las fibras aferentes conducidas, muy probablemente en su totalidad, por el nervio laríngeo superior.

**Palabras clave:** Nervios laríngeos. Laringe. Núcleo ambiguo. Dextrano. Rata.

## *Central projections of the rat recurrent laryngeal nerve*

**Abstract:** Laryngeal nerves contain the fibres that control the laryngeal function. The studies carried out on the rat with the purpose of having a better knowledge of the functional components and the real origin of the fibres conveyed by the recurrent laryngeal nerve (RLN) are few and in disagreement. No one of such papers were developed using biotinylated dextrane amines (BDA), a powerful tool for tracing neural pathways. The aim of our study was to identify in the rat using BDA, the nuclei of real origin of the fibres of the RLN, knowing in this way the functional components of this nerve. The study has been developed in 31 adult ma-

le Sprague-Dawley rats, applying the BDA into the lesioned RLN. The results obtained in all the animals show that the rat's RLN does not contain afferent fibres, whereas the efferent fibres were originated within the ipsilateral nucleus ambiguus (NA). So, in the rat, the RLN seems to contain exclusively efferent fibres, probably been the superior laryngeal nerve who conveyed the afferent fibres.

**Key words:** Laryngeal nerves. Larynx. Nucleus ambiguus. Dextrane amines. Rat.

## INTRODUCCIÓN

Desde Galeno es bien conocido que la laringe está conectada al sistema nervioso central mediante los denominados nervios laríngeos<sup>1</sup>. Estas ramas del nervio vago, el nervio laríngeo superior (NLS) y el nervio laríngeo inferior o recurrente (NLR), conducen las fibras de los sistemas aferente y eferente que controlan el funcionamiento de este órgano<sup>2</sup>.

Es comúnmente aceptado, mediante el estudio en diversas especies animales, que el núcleo de origen de las fibras eferentes laríngeas es el núcleo ambiguo (NA), columna situada ventrolateralmente en la médula oblongada compuesta por neuronas eferentes viscerales especiales y organizada somatotópicamente en sentido rostrocaudal para inervar la musculatura del esófago, la faringe y la laringe respectivamente<sup>3-9</sup>. Adicionalmente, otros autores han identificado una columna ventrolateral al NA "clásico" que está formada por neuronas eferentes viscerales generales, concretamente preganglionares parasimpáticas cardíacas<sup>9</sup>. Por otro lado, ciertos autores sostienen que el núcleo dorsal del vago es también origen de fibras eferentes laríngeas viscerales generales<sup>9,10</sup>.

Con respecto a las fibras aferentes laríngeas, su origen se ha descrito en el tracto solitario (TS) y el núcleo del tracto solitario (NTS)<sup>7,8</sup>.

Los estudios sobre los componentes funcionales del NLR en la rata son escasos y presentan importantes discrepancias<sup>10-12</sup>. Todos ellos fueron realizados mediante trazado con peroxidasa de rábano picante (HRP), que presenta importantes inconvenientes como su facilidad para difundir, al aplicarse, a estructuras adyacentes a la estructura a trazar y generar, por lo tanto, falsos positivos.

Los dextranos biotinados (BDA) se han descrito como

Correspondencia: Francisco J. Valderrama-Canales  
Departamento de Anatomía y Embriología Humana I.  
Facultad de Medicina, Universidad Complutense  
28040 Madrid  
E-mail: fvalde@med.ucm.es  
Fecha de recepción: 27-3-2006  
Fecha de aceptación: 24-4-2006

marcadores neuronales de gran precisión y transporte rápido, que revelan la estructura dendrítica y axonal de las neuronas marcadas<sup>13</sup>. En determinadas condiciones son transportados tanto retrógrada como anterógradamente lo que nos permite visualizar en el mismo animal las proyecciones central y periférica de las fibras trazadas<sup>14-16</sup>. Además, son moléculas muy solubles en soluciones acuosas, lo que permite su fácil manejo, y, en su forma lisinada, se unen a los tejidos fijados con aldehídos de forma que su señal no se pierde con el tiempo<sup>13</sup>.

Debido a estas cualidades técnicas y al hecho de que, en la bibliografía consultada, no se han empleado estos trazadores para estudiar las proyecciones centrales del NLR, nos planteamos el desarrollo de este trabajo. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio es identificar los núcleos de origen de las fibras conducidas por el NLR mediante el uso de los BDA. La información obtenida se empleará como base para un futuro modelo experimental de degeneración y regeneración nerviosa que utiliza la laringe, los nervios laringeos y los núcleos responsables de su inervación como modelo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 31 ratas Sprague-Dawley, machos, de entre 300 y 450 g de peso (3-4 meses de edad). Los individuos empleados se distribuyeron en 2 grupos experimentales según se aplicara el trazador en el NLR derecho o en el NLR izquierdo. Los datos sobre ellos se recogen en la Tabla 1.

El procedimiento experimental fue como sigue. Tras la anestesia (xilacina, 8 mg/Kg, y ketamina, 90 mg/Kg, i. p.), los animales se operaron realizando una incisión en la línea media del cuello, rechazándose lateralmente con un separador la piel, las glándulas submandibulares y los músculos infrahioideos. Una vez expuesto, y limpio de su envuelta fascial, el nervio recurrente se lesionó mediante sección parcial, por debajo del nivel de la glándula tiroides, junto al cuarto o quinto anillo traqueal, para facilitar la captación del trazador<sup>13,17</sup>. A continuación se cubrió con el BDA (Molecular Probes, Oregon, USA) -de peso molecular 10.000 (BDA 10k) o 3.000 (BDA 3k)- en forma de liofilizado hidratado sobre la punta de un fino alfiler entomológico (Tabla 1), cuidando especialmente de que ambos cabos de la lesión quedaban recubiertos por el trazador. Tras 10 minutos de espera la zona se limpió con solución salina, se cerraron los planos musculares y se suturó la piel<sup>16,18</sup>. Transcurridos 7 días, los animales fueron eutanasiados (pentobarbital, 12 mg/Kg, i. p.) y perfundidos transcardiacamente con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4). A continuación, se procedió a la extracción de los troncos del encéfalo que fueron procesados siguiendo dos pautas diferentes. Algunos fueron encastados en gelatina y cortados mediante vibratomo y otros, previa crioprotección por inmersión en sacarosa al 30% en tampón fosfato, se seccionaron mediante criostato (Tabla 1). En todos los casos las piezas se cortaron axialmente a 50  $\mu$ m de grosor. La

**Tabla 1:** Animales utilizados, indicando el nervio trazado, el peso molecular del dextrano utilizado, la técnica de sección empleada y el resultado del experimento (positivo: se observaron neuronas y/o fibras marcadas. Negativo: no se observaron estructuras marcadas)

Nervio/s	Dextrano	Vibratomo		Criostato	
		Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
NLRi	3k	-	7	2	-
	10k	3	9	1	7
NLRd	3k	-	-	1	1
	10k	-	-	-	-

NLRi: nervio laríngeo recurrente izquierdo. NLRd: nervio laríngeo recurrente derecho. 3k: dextrano de pm 3.000. 10k: dextrano de pm 10.000.

visualización del dextrano se realizó revelando las secciones, en flotación, con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vector, California, USA). Como cromógeno se empleó diaminobencidina intensificada con níquel (Vector, California, USA). Las secciones fueron montadas en portas según los protocolos habituales y, en algunos casos, se contrastaron ligeramente con violeta de cresilo.

Las neuronas se contaron en cada corte, debido a que el espesor de los mismos permite dicha cuantificación. El proceso se realizó con el objetivo 40X y siempre explorando con el micrométrico toda la profundidad de la sección. Se realizó la media de todas las neuronas observadas así como la desviación estándar de dicha media.

## RESULTADOS

Del total de animales estudiados identificamos el BDA en 8 troncos del encéfalo, de los cuales 4 se habían procesado en congelación y seccionado mediante criostato y los 3 restantes fueron cortados en vibratomo (Tabla 1). La obtención de resultados en la identificación del BDA, que en las primeras series fue muy insatisfactoria, mejoró, de manera notable, una vez que el protocolo general quedó definitivamente puesto a punto. Actualmente el marcaje se obtiene prácticamente en el 100% de los experimentos de trazado.

En todos los casos estudiados el marcaje fue ipsilateral al nervio trazado y no se observaron diferencias entre los lados izquierdo y derecho.

Todas las neuronas marcadas se localizaron en el NA (Fig. 1 A). El número de neuronas observadas quedó comprendido entre 121 y 214, con una media de 152 ( $S=33$ ) (Tabla 2). La mayoría de las neuronas presentan morfología multipolar (Fig. 1 B). En algunas secciones se identificaron fibras en el trayecto de formación del origen aparente del nervio, así como neuronas aberrantes (Fig. 2). En ningún caso se hallaron neuronas o fibras marcadas en otros territorios del tronco del encéfalo o de la médula espinal.

Los resultados obtenidos mediante los dos BDA utilizados son similares, siendo la principal diferencia observada entre ellos que el BDA 3k proporciona mayor intensidad

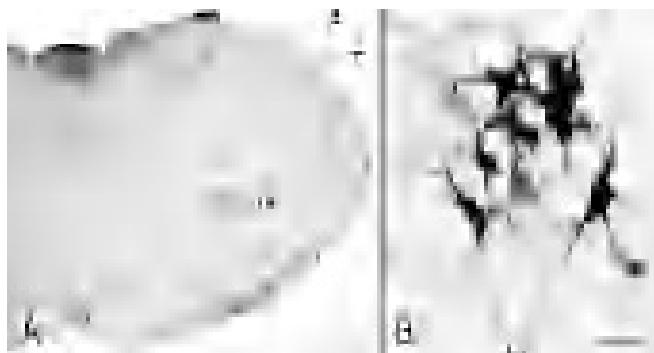


Figura 1. El trazado del nervio laríngeo recurrente marca, ipsilateralmente, neuronas en el núcleo ambigu (na). A. Aspecto general de una sección de la médula oblongada del tronco del encéfalo tras el trazado ipsilateral del nervio laríngeo recurrente con BDA 3k. Escala: 500  $\mu$ m. d: dorsal, l: lateral. B. Detalle de las neuronas del núcleo ambigu recuadradas en A. Obsérvese la morfología multipolar predominante, así como la excelente calidad proporcionada por el trazador de la morfología de las neuronas y sus proyecciones. Escala: 50  $\mu$ m.

de marcaje y una mejor visualización de los árboles dendríticos y el segmento inicial del axón que el BDA 10k. El aspecto granulado del citoplasma, por la presencia del trazador, es común a algunas de las neuronas marcadas e independiente del BDA utilizado, aunque en muchos casos la intensa captación del trazador muestra las neuronas homogéneamente oscurecidas e impide observar dicha granulación (Fig. 1 B).

## DISCUSIÓN

En las primeras series experimentales los resultados del BDA como marcador retrógrado no fueron enteramente satisfactorios, no influyendo en los mismos el uso de BDA 3k o BDA 10k. Los troncos del encéfalo eran procesados se-

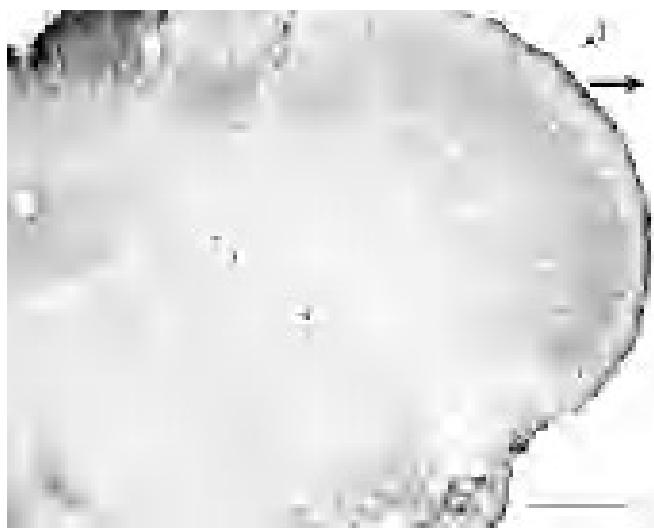


Figura 2. La presencia de las neuronas aberrantes es puesta de manifiesto mediante el trazado con el BDA 3k. Obsérvese su posición desplazada del área que corresponde al núcleo ambigu y su morfología fusiforme. Escala: 500  $\mu$ m. d: dorsal, l: lateral.

**Tabla 2:** Experimentos con resultado positivo (se observaron neuronas marcadas), indicando el nervio trazado, el peso molecular del dextrano utilizado, el número de neuronas contadas en cada caso y su ubicación y la media y la desviación típica de las neuronas cuantificadas

Animal	Nervio	Dextrano	Neuronas observadas
EMA1	NLRd	BDA 3k	147 NA ipsilateral
EVA7	NLRL	BDA 3k	163 NA ipsilateral
EMA2	NLRL	BDA 3k	139 NA ipsilateral
CV2	NLRL	BDA 10k	133 NA ipsilateral
CV4	NLRL	BDA 10k	121 NA ipsilateral
CV6	NLRL	BDA 10k	214 NA ipsilateral
C2IV	NLRL	BDA 10k	141 NA ipsilateral
Media	-	-	152 $\pm$ 33

NLRd: nervio laríngeo recurrente derecho. NLRL: nervio laríngeo recurrente izquierdo. 3k: dextrano de pm 3.000. 10k: dextrano de pm 10.000. NA: núcleo ambigu.

gún dos protocolos: encastrados en gelatina y seccionados mediante vibratomo o congelados y seccionados mediante criostato. Con ambas técnicas los resultados positivos eran escasos. Tras la puesta a punto de todo el protocolo, los resultados negativos fueron más frecuentes en las series procesadas por encastrado en gelatina. Sin embargo, los procesados por congelación consistentemente rendían resultados positivos. Estas diferencias podrían deberse a que la congelación de las piezas facilite la penetración de los reactivos, por la rotura de las membranas celulares, durante el revelado del BDA. Otra posible causa de las diferencias apreciadas, no siendo ambas excluyentes, es que el calor desprendido por la gelatina fundida durante el proceso de encastrado, afecte al BDA dificultando o imposibilitando los procesos para su visualización.

El trazado con BDA 3k o 10k fue, en ambos casos, bidireccional -anterógrado y retrógrado-, tal y como ha sido puesto de manifiesto por otros autores<sup>14,16</sup>. No obstante, el BDA 3k proporcionó mejores resultados en la identificación de detalles de los cuerpos neuronales (árboles dendríticos, segmento inicial del axón) de acuerdo con lo descrito en la literatura consultada<sup>16</sup>.

En los trazados del NLR se identificaron neuronas únicamente en el NA ipsilateral, no hallándose en ningún caso neuronas en otros territorios del tronco del encéfalo o de la médula espinal, tal y como ha sido descrito tanto en la rata<sup>10</sup> como en otras especies estudiadas<sup>5,6,19,20</sup>. Se contaron entre 121 y 214 neuronas marcadas por NA (media de 152, 33 de desviación estándar), dato absolutamente coincidente con las cuantificaciones previas de otros autores<sup>10</sup>. La morfología mayoritaria de las neuronas identificadas es multipolar, tal y como se ha descrito en otros trabajos<sup>5,8,19</sup>. También se han identificado las neuronas denominadas "aberrantes" por Cajal<sup>3</sup>.

Las fibras aferentes laríngeas, a través del NLS y del NLR, se incorporan al TS para terminar en el NTS<sup>7,8</sup>. Así, se considera que las aferencias de las regiones infraglóticas, con excepción del territorio ventral, son conducidas por el NLR<sup>2,21</sup>. En los resultados que hemos obtenido no se identi-

fican aferentes en el tronco del encéfalo ni en la médula espinal provenientes del NLR. En los pocos trabajos previos realizados en la rata se han registrado resultados dispares con respecto a la presencia de fibras del NLR en el TS. De este modo, se han descrito numerosas fibras ingresando bilateralmente, un número exiguo de fibras difusas y siempre ipsilaterales o no se cita la presencia de fibras<sup>10-12</sup>. Comparando estos resultados con nuestro modelo experimental, las diferencias podrían justificarse en las diferentes técnicas empleadas, BDA frente a HRP, y también desde el punto de vista anatómico por las conexiones de los NLR y NLS<sup>13,16,22</sup>.

Desde el punto de vista técnico, son comúnmente conocidos los inconvenientes que presenta la HRP, por su fácil difusión, al ser captada indeseadamente por las fibras y terminales nerviosos circundantes a la estructura objeto de estudio, lo que provoca en ocasiones falsos positivos. Los BDA difunden muy poco y, además, su captación por fibras no lesionadas es mínima, resultando mucho más fiable como trazador<sup>13,16</sup>.

Desde una aproximación anatómica, estos resultados también podrían explicarse por el hecho de que el NLS y el NLR se encuentran ampliamente conectados en el interior de la laringe de la rata (observaciones no publicadas). Estas comunicaciones entre ambos nervios laríngeos han sido bien descritas en humanos<sup>22</sup>. De esta forma, las proyecciones aferentes de las regiones infraglóticas podrían ser conducidas por tales conexiones hacia el NLS y, a través de él, hacia los territorios ipsilaterales de los mencionados núcleos troncoencefálicos.

## AGRADECIMIENTOS

A los profesores A. González, L. Medina y A. Muñoz por sus comentarios e importantísima ayuda en todos los aspectos técnicos del uso de trazadores neuronales. Este proyecto ha sido financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social PI-0035, 2004-2007.

## Referencias

1. Morrison MD. Recurrent laryngeal nerve paralysis. A revised conception based on the dissection of one hundred cadavers. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1952;61:567-592.
2. Wyke BD, Kirchner JA. Neurology of the larynx. En: Hinchcliffe R, Harrison D (Eds): *Scientific Foundations of Otolaryngology*, William Heinemann Medical Books, London (UK) 1976;546-574.
3. Ramón y Cajal S. *Histologie du Système Nerveux de l'homme et des vertébrés*. Maloine, París 1909.
4. Molhant M. 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. *Névraxe* 1912;13:9-316.
5. Lawn AM. 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* 1966;127:293-306.
6. Lawn AM. The nucleus ambiguus of the rabbit. *J Comp Neurol* 1966;127:307-320.
7. Kalia M, Mesulam MM. 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* 1980;193:435-465.
8. Kalia M, Mesulam MM. Brain Stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: II. Laryngeal, tracheobronchial, pulmonary, cardiac and gastrointesinal branches. *J Comp Neurol* 1980;193:467-508.
9. Bieger D, Hopkins DA. Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the medulla oblongata in the rat: the nucleus ambiguus. *J Comp Neurol* 1987;262:546-562.
10. Hinrichsen CFL, Ryan T. Localization of laryngeal motoneurons in the rat: morphologic evidence for dual innervation? *Exp Neurol* 1981;74:341-355.
11. Hisa Y, Lyon MJ, Malmgren LT. Central projection of the sensory component of the rat recurrent laryngeal nerve. *Neurosci Lett* 1985; 5:185-190.
12. Patrickson JW, Smith TE, Zhou JW. Afferent projections of the superior and recurrent laryngeal nerves. *Brain Res* 1991;539:169-174.
13. Glover JC, Petrusdottir G, Jansen KS. Fluorescent dextran-amines used as axonal tracers in the nervous system of the chicken embryo. *J Neurosci Methods* 1986;18:243-254.
14. Fritzsch B. Fast axonal diffusion of 3000 molecular weight dextran amines. *J Neurosci Methods* 1993;50 (1):95-103.
15. Marin O, Gonzalez A. Origin of tectal cholinergic projections in amphibians: a combiner study of choline acetyl transferase immunohistochemistry and retrograde transport of dextran amines. *Visual Neurosci* 1999;16:271-283.
16. Reiner A, Veenman CL, Medina L, Jiao Y, Del Mar N, Honig MG. Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J Neurosci Methods* 2000;103:23-37.
17. Fritzsch B, Sonntag R. Sequential double labelling with different fluorescent dyes coupled to dextran amines as a tool to estimate the accuracy of tracer application and of regeneration. *J Neurosci Methods* 1991;39:9-17.
18. Popov S, Poo MM. Diffusional transport of macromolecules in developing nerve processes. *J Neurosci* 1992;12:77-85.
19. Schewitzer H, Ruebsamen R, Ruehle C. Localization of brain stem motoneurons innervating the laryngeal muscles in the rufous orsees-hoe bat. *Brain Res* 1981;230:41-50.
20. Nomura S, Mizuno N. Central distribution of efferent and afferent components of the cervical branches of the vagus nerve. A HRP study in the cat. *Anat Embryol* 1983;166:1-18.
21. Suzuki M, Kirchner JA. Afferent nerve fibers in the external branch of the superior laryngeal nerve in the cat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1968;77:1059-1070.
22. Sanudo JR, Maranillo E, León X, Mirapeix RM, Orús C, Quer M. An anatomical study of anastomoses between the laryngeal nerves. *Laryngoscope* 1999;109:983-987.