ESTUDIO MORFOFOTOMETRICO Y POR ANALISIS DE IMAGEN DE POBLACIONES CELULARES DE CARCINOMA EPIDERMOIDE DE LARINGE:VALOR PRONOSTICO

Tesis presentada por:

Francisco J.Fernandez Nogueras Jimenez
para optar al Grado de Doctor
en Medicina y Cirugia

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA

Curso de 1988 a 1989 Folio 54 vto. Número 109

Reunido en el dia de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. Francisco J. Fernandez Nogueras Jimenez el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente habia elegido: Estudio morfofotométrico y por análisis de imagen de poblaciones celulares de carcinoma epidermoide de laringe: Valor pronóstico

Terminada la lectura y contestadas la objecciones formuladas por los Jueces del Tribunal, este le calificó de apto cum laude

Granada 1 de julio de 1989

EL PRESIDENTE,

Fdo.: M. SAINZ

El Secretario del Tribunal,

Fdo.: Eloy López Mauchén

EL VOCAL.

Fdo: Rafael Sa. Tapia

EL VOCAL.

Fdo.: Juan Linares Solano.

EL VOCAL.

Fdo.: Lorenzo Zaragoza

FIRMA DEL GRADUANDO.

Dpto de Cirugía y sus Especialidades (Otorrinolaringología)

DON MIGUEL CIGES JUAN, CATEDRATICO DE OTORRINOLARINGOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE GRANADA

CERTIFICO:

Que Don FRANCISCO JOSE FERNANDEZ-NOGUERAS JIMENEZS, LICENCIADO EN MEDICINA Y CIRUGIA, ha realizado bajo mi dirección los trabajos de investigación correspondientes a su Tesis Doctoral "ESTUDIO MORFOFOTOMETRICO Y POR ANALISIS DE IMAGEN DE POBLACIONES CELULARES DE CARCINOMA EPIDERMOIDE DE LARINGE: VALOR PRONOSTICO".

Granada, Junio de mil novecientos ochenta y nueve.

DON JOSE JAVIER ESQUIVIAS LOPEZ-CUERVO, DOCTOR EN MEDICINA, MEDICO ADJUNTO DEL SERVICIO DE ANATOMIA PATOLOGICA DEL HOSPITAL "VIRGEN DE LAS NIEVES" DE GRANADA

CERTIFICO:

Que Don FRANCISCO JOSE FERNANDEZ-NOGUERAS JIMENEZ, LICENCIADO EN MEDICINA Y CIRUGIA, ha realizado bajo mi dirección los trabajos correspondientes a su Tesis Doctoral "ESTUDIO MORFOFOTOMETRICO Y POR ANALISIS DE IMAGEN DE POBLACIONES CELULARES DE CARCINOMA EPIDERMOIDE DE LARINGE: VALOR PRONOSTICO".

Granada, Junio de mil novecientos ochenta y nueve.

A Maria Jesús.

A mi hija.

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este trabajo quiero expresar mi gratitud a todas aquellas personas que de una forma u otra han contribuido a su realización:

-a Don Miguel Ciges por su orientación constante y sabia dirección.Por haber respondido a mi solicitud ahora como en otras ocasiones.De nuevo mi más sincero agradecimiento.

-a Javier por su amistad,por su generoso ofrecimiento de tiempo y medios,por haber querido compartir muchas horas de esfuerzo,desánimo e ilusión trabajando conmigo con una capacidad y fuerza de voluntad envidiables.

-a Don Juan Diaz Garcia por su inestimable ayuda en la programación,manejo y disponibilidad del analizador de imagen.

-a Don Emilio Sanchez Cantalejo por su colaboración y aportación personal al cálculo estadístico.

-a Don Enrique Montero Garcia por facilitar cordial y desinteresadamente mi labor dentro y fuera del laboratorio.

-a Mercedes y los niños por haber soportado amable y educadamente mi reiterativa presencia.

-a mi familia por el estímulo que para mi ha supuesto en todo momento.

INDICE

pag.

1.- INTRODUCCION

1-1.-Preliminares.....1

1-2.- Revisión histórica

1-2-1.- Evolución en el conocimiento del carcinoma de laringe.....5

1-2-2.-Teoría celular.....6

1-2-3.- Clasificaciones clínicas del carcinoma de laringe.....8

1-2-4.- Exploración instrumental.....11

1-2-5.- Cirugía.....13

1-3.- Embriología de la laringe.....17

1-4.- Anatomía laríngea aplicada(Macro y microscópica).....21

1-4-1.- Anatomía microscópica de mucosa y submucosa.....26

1-4-2.- Compartimentación laríngea.....26

1-4-2-1.- Ligamentos intrínsecos.....29

1-4-2-2.- Compartimentos laríngeos.....30

1-4-3.- Drenaje linfático.....32

pag.

1-5.- Anatomía Patológica del cancer laríngeo

1-5-1.- Transformación maligna.....36

1-5-2.- Clasificación de lesiones premalignas.....37

1-5-3.- Carcincma invasivo.....40

1-5-4.- Clasificación histológica del carcinoma epidermoide laríngeo.....41

1-5-5.- Anatomía Patológica macroscópica del carcinoma epidermoide laríngeo.....43

1-5-5-1.- Carcinomas supragloticos.....44

1-5-5-2.- Carcinomas gloticos.....47

1-5-5-3.- Carcinomas subgloticos.....48

1-5-5-4.- Carcinomas transgloticos.....49

1-5-6.- Tipos histológicos del cancer laríngeo

1-5-6-1.- De estirpe epitelial.....51

1-5-6-1-1.-Carcinoma de células escamosas.....51

1-5-6-1-2.-Carcinoma verrugoso.....57

1-5-6-1-3.-Linfoepitelioma.....57

1-5-6-1-4.-Pseudosarcoma.....58

pag.

1-5-6-2.- Carcinosarcomas.....61

1-5-6-3.- Tumores no epiteliales.....61

1-5-6-4.- Tumores metastásicos.....62

1-6.- Puesta al dia de los hallazgos anatomopatológicos de interés pronóstico en el cancer laríngeo

1-6-1.- Caracteristicas anatomopatológicas del tumor primario.....63

1-6-2.- Cancer laríngeo y respuesta inmunitaria

1-6-2-1.- Respuesta inmunitaria local.....68

1-6-2-2.- Respuesta inmunitaria regional..72

1-7.- Concepto de Patología Cuantitativa.Fundamentos de morfometría,fotometría y análisis de imagen

1-7-1.- Morfometría.....79

1-7-2.- Fotometría.....80

1-7-3.- Fotometría de flujo.....84

1-7-4.- Análisis de imagen.....84

2.- OBJETIVOS.....89

pag.

3.- MATERIAL Y METODOS

3-1.- Material

3-1-1.- Casos(Preparaciones de archivo).....91

3-1-2.- Microscopio.....91

3-1-3.- Fotografia de los cortes 91

3-1-4.- Fotómetro.....92

3-1-5.- Analizador de Imagen.....92

3-1-6.- Ordenador.....93

3-2.- Métodos

3-2-1.- Métodos histológicos.....93

3-2-2.- Parámetros histológicos estudiados.....96

3-2-3.- Variable J.....99

3-2-4.- Estudio morfofotométrico.....99

3-2-4-1.- Análisis morfométrico.....99

3-2-4-2.- Análisis fotométrico.....103

3-2-4-3.- Valor ET,H,X,Y,Z.....105

3-2-4-4.- Grado de malignidad.....106

pag.

3-2-5.- Análisis de imagen.....107

3-2-6.- Tratamiento estadístico.....110

3-2-7.- Almacenamiento y tratamiento de los datos.....110

4.-RESULTADOS

4-1.- Generalidades.....111

4-2.- Estudio histológico.....112

4-2-1.- Tumor primario.....112

4-2-1-1.- Diferenciación.....112

4-2-1-2.- Queratinización.....112

4-2-1-3.- Infiltración linfoide.....113

4-2-1-4.- Crecimiemto tumoral.....113

4-2-1-5.- Fibrosis.....113

4-2-1-6.- Invasión vascular.....114

4-2-1-7.- Necrosis.....114

4-2-1-8.- Actividad mitótica 114

4-2-1-9.- Limites quirúrgicos.....114

pag.

4-2-1-10. Supervivencia.....115

4-2-1-11.-Valor pronóstico de los datos anatomopatológicos.....115

4-2-1-12.-Valor pronóstico de la actividad mitótica del tumor.....116

4-2-2.- Adenopatías cervicales.....116

4-2-2-1.- Tamaño de las adenopatías metastásicas y supervivencia...116

4-2-2-2.- Número de adenopatías metastásicas y supervivencia...117

4-2-2-3.- Infiltración tumoral periganglionar y supervivencia.....117

4-2-2-4.-Patrón histológico ganglionar...117

4-3.- Estudio morfofotométrico

4-3-1.-ET.....120

4-3-2.-ET de células tumorales y no tumorales.120

4-3-3.- ET de células basales,intermedia y superficiales,tumorales y no tumorales121

4-3-4.- ET y diferenciación.....122

4-3-5.- ET y queratinización.....122

pag.

4-3-6.- ET y actividad mitótica.....123

4-3-7.- ET y J.....123

4-3-8.- ET y Supervivencia.....123

4-3-9.- ET y H,X,Y,Z.....125

4-4.- Relación de los parámetros histológicos y morfofotométricos con la supervivencia.....126

4-5.- Grado de malignidad y supervivencia.....128

4-6.- Estudio mediante análisis de imagen

4-6-1.- Area nuclear de células tumorales y no tumorales.....129

4-6-2.- Factor de forma de células tumorales y no tumorales.....129

4-6-3.- Transmisión nuclear de células tumorales y no tumorales.....129

4-7.- Correlación entre absorción nuclear mediante fotometría y transmisión nuclear mediante densitometría.....130

5.- DISCUSION

5-1.- Parámetros clínicos.....131

5-2.- Estudio histológico.....131

pag.

5-3.- Estudio morfofotométrico.....141

5-4.- Relación entre parámetros histológicos y morfofotométricos con supervivencia.....145

5-5.- Análisis de imagen.....149

5-6.- Interpretación de la biología tumoral a través de los resultados morfofotométricos...152

6.- CONCLUSIONES.....160

7.- BIBLIOGRAFIA.....164

1 INTRODUCCION

1-1.-PRELIMINARES

Desde siempre el saber médico ha tenido una de sus fuentes en ese modo de adquirir conocimientos valiosos y conquistar prácticas útiles a que solemos dar el nombre de empirismo,esto es,el hallazgo fortuito o planeado de realidades nuevas,aspectos nuevos de la realidad ya conocidos,o nuevos comportamientos ante el mundo sin que su descubridor,en un primer momento al menos,haya intentado interpretarlos con un designio racional o teórico.De tal fuente procederá buena parte del saber y el quehacer de los médicos y a la conquista empírica del mundo van a entregarse no pocos de los mejores prácticos de la medicina europea hasta finales del siglo XVIII primero con ánimo de aventura,azarosamente,y luego de manera metódica y racionalizada,mediantre el empleo de reglas capaces de ordenar con un fin determinado,aún sin interpretarlos teoréticamente los hechos descubiertos a favor de la pura experiencia.

Uno de los campos en que dará su fruto este empirismo médico racionalizado de los siglos XVI al XVIII es el anatomopatológico.

En la joven Europa de la baja edad media y el siglo XV la reiteración de las autopsias de cadáveres,cualquiera que fuese el fin a que con ellas se aspiraba,condujo al descubrimiento de lesiones morbosas en el interior de los cuerpos disecados y despertó en los médicos el afán intelectual de ponerlas en conexión con la dolencia padecida a fin de conocer con más seguridad su causa.De tal afán nacerá una de las más fecundas vias para la conversión de la medicina en verdadera ciencia,el método anatomoclínico.Ahora bien,en la historia de éste deben distinguirse tres etapas:en la primera la lesión es para el médico un hallazgo de autopsia,en la segunda la clave de un diagnóstico y en la tercera el fundamento de todo el saber clínico

y aún de toda la patologia.En esta tercera etapa la ambición del médico es mayor porque éste aspira a diagnosticar con seguridad e "intravitam" la lesión causante de la enfermedad a que atiende.

Durante el siglo XIX continuan aún vigentes las dos reglas básicas para el conocimiento científico de la realidad que establecieron los pensadores presocráticos:el principio de "autopsia",visión de las cosas por uno mismo y el principio de "hermeneia" o referencia interpretativa de "lo que se ve" para,de esta forma,acercarnos a "lo que es".

Tres pueden considerarse los métodos cardinales con que el sabio moderno practica su visión científica de la realidad:la observación,la experimentación y la mensuración.La observación directa se ve facilitada por la utilización a partir de 1800 del microscopio apocromático y el desarrollo de diversos métodos de tinción que permitirán el colosal avance de la citologia y la histologia ulteriores al nacimiento de la teoria celular.

Pese a la resistencia de algunos a la práctica de experimentos de vivisección ésta se impone de forma arrolladora en todos los campos de la ciencia por lo que a los modos de experimentación ya existentes se añadirá otro,el analítico o "bernardiano" (LAIN 1978).

Hasta el comienzo del siglo XVIII la mensuración científica no pasaba del mero recuento,la medición geométrica:longitud,superficie y volumen;la termometria y la pesada.Años más tarde podrá conocerse la magnitud del metabolismo de base o la relación entre el estímulo y la sensación,entre otras.Nada parece escaparse de la mensuración y el hombre de ciencia cree que sólo empieza a serlo de verdad cuando actua ante la realidad como "mens mensurns".

Por último mediante la interpretación de lo observado o medido,es decir,ordenando el hecho en la trama de una teoria que lo haga inteligible,los datos que brindan la observación,la mensuración y la experimentación se convierten en saberes verdaderamente científicos.

En nuestro siglo los dos principios metódicos que rigen desde los orígenes de la visión científica del mundo,el principio de observación y el de interpretación de la realidad siguen por supuesto vigentes.La aprhensión científica de la realidad,la metódica observación de datos para el conocimiento científico de lo real,sigue tomando como recursos la observación,la mensuración y la experimentación.Pero si ya la instrumentación y la matematización del conocimiento habian modelado la concepción y ejecución de los principios básicos antes mencionados a mediados del siglo XIX,más importantes todavia serán las novedades introducidas posteriormente.Como una de esas novedades debe considerarse el desarrollo a finales de los años setenta de las técnicas que permitieron el nacimiento de la patologia "cuantitativa" frente a la idea tradicional cualitativa de esta disciplina.

En este sentido el presente trabajo de tesis no es más que un intento de mensuración y cuantificación de diversos parámetros,hasta ahora poco conocidos,que se hace posible gracias al empleo de técnicas de adquisición reciente tales como la citomorfofotometria y el análisis de imagen,en carcinomas epidermoides de laringe.

De esta forma en el marco de lo expuesto hasta ahora como introducción puede decirse que con nuestro esfuerzo no hemos hecho más que desarrollar uno de los recursos básicos que vienen empleándose a lo largo de la historia para el conocimiento científico de la enfermedad,en este caso concreto limitándonos a la patologia tumoral de laringe,uno de los problemas más importantes a los

que se ha enfrentado el otorrinolaringólogo durante siglos.

1-2.-REVISION HISTORICA.

1-2-1.-Evolución en el conocimiento del carcinoma de laringe.

Las investigaciones que se ocupan de la oncologia laringea están tan intimamente relacionadas con los hallazgos exploratorios,quirúrgicos y anatomopatológicos,que no es posible una visión cronológica de las contribuciones de investigadores individuales o por grupos sin hacer referencia histórica a los estudios sobre laringoscopia,cirugia e histologia que se han ido sucediendo a lo largo del tiempo.

La primera referencia al cancer laringeo se atribuye a ARETEO en el año 100 d. de J.C.Cien años más tarde GALENO describe una "úlcera maligna" de la garganta y aparentemente comprende la naturaleza y gravedad del cancer de laringe.En la edad media no hay ninguna referencia al cancer laringeo en la literatura occidental.Durante el renacimiento BOERHAAVE (1688) describe lo que él llama "angina cancerosa" y en 1732 MORGAGNI reseña claramente la autopsia de dos casos de carcinoma laringeo.

Antes del S.XVIII las enfermedades laringeas en general se describen como "cynanche traquealis".Posteriormente se habló de "angina" y "tisis" términos que aún hoy existen pero con un significado totalmente distinto.El término "tisis" se aplicaba en aquella época a cualquier enfermedad crónica que llevaba al paciente a la consunción o la muerte.Otra expresión:"sarcoma" se usaba para describir una lesión a medio camino entre la benignidad y la malignidad.En 1839 comienza a usarse

el término "tuberculosis" con un sentido también distinto al que hoy tiene.En 1837 TROUSSEAU y BELLOC publican una obra en la que hacen referencia a cuatro tipos de "tisis" laringea,uno de ellos es el llamado "laringotisis carcinomatosa".La obra de TROUSSEAU muestra que lo que hoy entendemos por enfermedades granulomatosas como la sífilis y la tuberculosis no se distinguen claramente del carcinoma,por el contrario,es de esperar que se presentaran con frecuencia de forma simultanea aumentando de esta manera la confusión entre los patólogos de la época.

1-2-2.-Teoria celular

La metódica aplicación del microscopio y los considerables progresos técnicos en la construcción y manejo del mismo (objetivos de inmersión en agua y aceite etc..) dieron al traste con la teoria fibrilar y condujeron a la creación de una nueva teoria biológica,la teoria celular.Ya en pleno setecientos WOLF hizo notar que el examen microscópico de los tejidos animales no permite ver fibras sino "glóbulos" organizados más tarde en vesículas y membranas.Uno de los principales escollos que tuvo que salvar la recién nacida teoria celular para su consolidación fue el de la citogénesis.Para el botánico M. J. SCHLEIDEN (1804-1881) las células se formarian en el seno de un blastema originario y homogeneo,como consecuencia de un proceso morfogenético en el cual el "citoblasto" (nucleo) actua como centro de cristalización.Es decir,lo diferenciado (célula) procederia de lo indiferenciado (blastema originario).Es la "generatio aequivoca" de SCHLEIDEN.Fue REMACK (1852) quien demostró que las células pueden multiplicarse por división interna.Pero se considera que fue RUDOLF VIRCHOW (1821-1902) el verdadero fundador de la doctrina de la "generatio univoca".El principio "toda célula procede de otra célula" vino a la mente de VIRCHOW

como resultado de tres series de observaciones:la cicatrización de las heridas corneal[illegible] estudio a fondo de la histogénesis de los tejido[illegible]onjuntivo y cartilaginoso y tercera y más importante,un examen metódico de la anómala proliferación de las células cancerosas.

De esta forma y dando un gran paso,lo que en sus comienzos fue un empirismo anatomopatológico se convierte en el estudio de la patologia celular.Es precisamente VIRCHOW en su monumental obra sobre histologia,el habitualmente llamado "VIRCHOW's archiv" del que hasta la muerte de su autor habian de aparecer 170 volúmenes,el primero en distinguir desde el punto d[illegible] vista anatomopatológico,en el sentido que hoy se da a este término,entre varias anomalias laringeas.

Un ejemplo claro del cambio de mentalidad en cuanto a la búsqueda de una base sólida para la comprensión de la patologia laringea es el siguiente.En enero de 1887 el principe FEDERICO III de Prusia de 55 años inicia una ronquera.GERHART de la universidad de Berlin observa un nódulo rosado de unos 4mm en la cuerda vocal izquierda.Intenta extirpar la lesión con un lazo pero sólo consigue extraerla parcialmente.Tras trece sesiones de galvanocauterización comienza a sospechar una lesión cancerosa por lo que busca la opinión de BERGMAN catedrático de cirugia y TOBOLD laringólogo.Ambos son partidarios de la inmediata extirpación quirúrgica por laringofisura,planeándose además una laringectomia total en caso necesario.En este momento se llama a MORELL MACKENZIE para que emita su juicio clínico.Cuando examinó al paciente MACKENZIE observó un nódulo del tamaño de un guisante en la parte posterior de la cuerda vocal izquierda,habia una ligera disminución de la motilidad así como una cierta congestión mucosa.Inmediatamente MACKENZIE y como primera medida extirpa parte del nódulo y lo

envia al gran patólogo VIRCHOW.Con este modo de actuar en 1887 MACKENZIE se adelanta a su tiempo y preludia lo que posteriormente se considerará el proceder habitual de cualquier laringólogo.Curiosamente VIRCHOW tras el examen microscópico de tres piezas de biopsia enviadas por MACKENZIE no pudo hallar evidencia de malignidad y los clínicos a pesar de la negatividad anatomopatológica coincidieron en el diagnóstico de carcinoma,que tal y como se desarrollaron los acontecimientos parece más que probable.

1-2-3.-Clasificación clínica del carcinoma laringeo.

En 1876 ISAMBERT propuso la clasificación del carcinoma laringeo en extrínseco,intrínseco y subglótico.Tres años más tarde KRISHABER hace referencia a carcinomas extrínsecos e intrínsecos incluyendo en los extrínsecos los tumores de hipofaringe y los supraglóticos.Se sabia que los tumores intrínsecos,a diferencia de los extrínsecos se caracterizaban por su crecimiento lento y la aparición tardia de metástasis.

La clasificación de KRISHABER fue la base para la descripción de los tumores laringeos durante los siguientes cincuenta años hasta que fue reemplazada por la clasificación por estadios aún hoy vigente.

La distinción hecha por KRISHABER del diferente comportamiento de los carcinomas extínseco e intrínseco representó una gran contribución permitiendo una racionalización del pronóstico y la terapeutica.

A pesar de estos avances todavia en 1880 el profesor STORK hace referencia al cancer de laringe como una entidad rara y que "asienta en los pliegues mucosos existentes entre la epiglotis y la lengua o entre la epiglotis y el esófago".

En 1953 la OMS estableció una serie de recomendaciones para la clasificación de los casos de cancer laringeo por las caracteristicas del tumor primitivo y de las metástasis.Se ideó el sistema TNM,representando las caracteridticas del tumor primario,los ganglios regionales y las metástasis a distancia.

El Comité Latinoamericano para el estudio del cancer de laringe y la Unión Internacional Contra el Cancer (JUAC o UICC) también intentaron establecer un método para la clasificación clínica del cancer laringeo.Esta última organización publicó en 1956 un sistema que clasificaba tumores con diversas caracteristicas TNM en grupos más amplios con una supervivencia parecida (estadios I-IV).

Un TNM más generalmente aceptado fue desarrollado en 1962 por la "American Joint Comittee for Cancer Staging and End Result Reporting" (AJC) basado en los resultados finales del tratamiento de 600 casos en siete instituciones representativas.Estos criterios se revisaron en 1971.Mientras el sistema de 1962 clasificaba los tumores primitivos basándose en la extensión en superficie de la mucosa afectada, el de 1971 era más tridimensional tomando en consideración la fijación de la laringe como una indicación de afectación tumoral profunda.De esta manera los casos con fijación limitados a la laringe se confinaron en un grupo T3 nuevo,mientras que los casos con afectación mucosa importante sin fijación se consideraron T2.

TUCKER y colabs. (1976) compararon los hallazgos patológicos y los resultados finales en 100 casos clasificados originalmente por el método de 1962 y posteriormente por el de 1971 y hallaron que este último proporciona una correlación más satisfactoria entre clasificación clínica,patológica y resultados finales.

El sistema de estadios de la AJC fue revisado en 1976 y esta institución publicó al año siguiente un extenso manual exponiendo los sitemas de clasificación por estadios que se emplean actualmente para los tumores de diversos órganos.La revisión de 1976 es básicamente similar a la de 1971,pero ha sido simplificada y flexibilizada para eliminar algunos puntos que se prestaban a confusión.En relación con los tumores supragloticos T3,la vaga descripción de 1971:"tumor limitado a la laringe con fijación y/o destrucción u otra evidencia de invasión profunda",se ha hecho más especifica:"tumor limitado a la laringe con fijación y/o extensión que comprende el area postcricoidea,la pared medial del seno piriforme o el espacio preepiglótico".

La clasificación N experimenta una gran mejora habiendose eliminado el concepto subjetivo de fijación de las metástasis ganglionares.La nueva clasificación se basa en el tamaño y número de los nódulos palpables,de más fácil evaluación.

Por último añadir que el sitema TNM es un método clínico de clasificación por estadios,basado en el examen preoperatorio.Sin embargo,el mismo,puede usarse con más precisión para la clasificación patológica postquirúrgica.

1-2-4.-Exploración instrumental.

Para el conocimiento de la patologia laringea
fueron necesarios una serie de avances en la exploración y el tratamiento quirúrgico que dieron lugar al desarrollo de la laringologia como especialidad médica en la segunda mitad del S. XIX.

Como era de esperar la sucesión de acontecimientos no es ordenada ni secuencial aunque en la exposición de los mismos se haya preferido agrupar los más relacionados entre si con vistas a una mejor comprensión.

Ya en el S. XV-XVI LEONARDO DA VINCI muestra gran interés por el mecanismo del lenguaje estudiando en profundidad la anatomia y fisiologia laringeas.Más tarde MULLER y FERRIN (S. XVIII) llevan a cabo un curioso experimento para intentar explicar el mecanismo de la fonación,hacen pasar una corriente de aire a traves de una laringe de cadaver comparando el comportamiento de las hasta entonces llamados "labios vocales" a las cuerdas de un clavicembalo,dando a estos "labios" la denominación de "cuerdas vocales".

En la primera mitad del S. XVIII,hacia 1743 LEVERETT examina por primera vez la garganta con un espejo curvo.En 1807 BOZZINI manifestó haber visto la laringe con un espejo curvo,una vela y un reflector.En 1828 BABINGTON presentó en la "Hunterian society" de Londres su "glotiscopio" consistente en un depresor lingual combinado con un espejo que se mantiene en el paladar,la iluminación provenia de la luz del sol que se refleja en un espejo que se mantiene con la mano.AVERY (1844) introduce una serie de midificaciones sobre el proceder de BABINGTON,usa como reflector un espejo sujeto a la cabeza y como fuente luminosa una lámpara de aceite también sujeta

a la cabeza.El laringoscopio de AVERY no fue descrito públicamente hasta 18 años después de su descubrimiento aunque su autor lo empleó con éxito durante todo ese tiempo.Sin embargo,es diez años más tarde cuando un profesor de canto de origen español,MANUEL GARCIA desarrolla un método de examen laringeo práctico sencillo y comunmente aceptado,usa un espejo de dentista de mango largo y como fuente lumonosa la luz del sol reflejada en un espejo sostenido con la mano.En 1855 comunica su descubrimiento a la Royal Society de Londres con lo que se asegura la paternidad del mismo y es por ello considerado padre de la laringologia.

Hasta entonces la laringoscopia no era una exploración usual y la mayoria de las médicos desconocian por completo su técnica.Es a raiz del descubrimiento de GARCIA cuando en 1855 TURCK de Viena aplica la laringoscopia con espejo al diagnóstico de enfermedades laringeas en niños aunque se vio dificultado por la constante falta de luz solar.En el mismo año un antiguo colega suyo CZERMAK da un gran paso en la popularización de la laringoscopia clínica mediante el uso de la luz artificial y de un espejo cóncavo sujeto con los dientes,lo cual le permite dejar una mano libre.Gracias al diseño de pinzas e instrumental curvo poco después LEWIN (1861) es el primero en extirpar quirúrgicamente un tumor laringeo por via indirecta.De esta forma nace la laringologia como especialidad médica aparte.Uno de estos primeros especialistas es MORELL MACKENZIE que ya en 1863 era reconocido como una gran autoridad en el campo de la laringologia médica.Con MACKENZIE puede considerarse que la exploración laringea por via indirecta alcanza un amplio reconocimiento y una difusión cada vez mayor.No obstante la técnica de la exploración laringea continua evolucionando y en 1895 KIRSTEIN desarrolla instrumentos que permiten observar directamente la laringe con iluminación externa.Otro autor KILLIAN (1912) comienza a trabajar con sus

pacientes en decúbito dorsal y valiéndose de un sistema de suspensión llamado "horca de KILLIAN",consigue mantener las dos manos libres para la realización de curas o pequeñas intervenciones quirúrgicas.La idea de la exploración directa de la laringe continua evolucionando de forma relativamente rápida hasta alcanzar caracteísticas muy similares a las actuales gracias a la sucesión de tres hechos:la utilización de sistemas de magnificación por JACKSON y BRÖNING (1910) en laringoscopios diseñados por ellos mismos,el empleo de anestesia general en la laringoscopia directa hacia 1950 y la introducción en 1958 por KLEINSSASER,laringólogo y patólogo,de un "telescopio" magnificador y de un soporte precordial parecido al que RICKER usara con anterioridad.

1-2-5.-Cirugía.

El otro pilar fundamental sobre el que asienta la laringologia como ciencia es la cirugia,que a diferencia de lo que cabria esperar y sobre todo en sus comienzos sigue un camino distinto a las técnicas laringoscópicas que progresivamente se desarrollan y a las que precede en algunos casos.Sorprende comprobar que 76 años antes del descubrimiento de GARCIA,PELLETAN abriera quirúgicamente la laringe para extraer un trozo de carne impactada.Poco más tarde DESAULT (1810) practica una laringofisura muy similar en cuanto a técnica a las que se practican hoy dia,para la extracción de un cuerpo extraño y GURDON BUCK (1851) usa la laringofisura por primera vez para el tratamiento de un carcinoma laringeo.

La primera laringectomia total se practica en 1866 por WATSON en un paciente afecto de sifilis laringea.Un año más tarde COHEN logra la primera curación documentada de carcinoma tratado mediante laringofisura.En 1873 BILLROHT practica la

primera laringectomia total en un paciente con cancer,el cual murió a los siete meses como consecuencia de una recidiva.Cinco años más tarde este mismo autor lleva a cabo la primera hemilaringectomia vertical.En su primera laringectomia total BILLROHT sutura la piel a los bordes de la mucosa faringea y un discípulo suyo GUSSENBAUER diseñó una cánula de traqueostomia con una válvula y un tubo para desviar el flujo de aire con lo cual el paciente logró hablar.Dos años más tarde BOTTINI practica la primera laringectomia con éxito en un paciente cuyo diagnóstico anatomopatológico era de "sarcoma de células redondas y fusiformes".El paciente sobrevivió diez años tras la intervención.A pesar del entusiasmo de los primeros momentos el pronóstico de los pacientes laringectomizados no fue excesivamente bueno hasta que COHEN (1892) idea el principio de suturar el muñón traqueal a la piel.Esta técnica fue perfeccionada posteriormente por GLUCK y SORENSONal suturar la traquea a piel de forma separada para formar un traqueostoma y cerrar la faringe en la misma intervención.El proceder de GLUCK y SORENSON aunque técnicamente más avanzado no contempla en absoluto la posibilidad de evitar la pérdida de la voz tras la cirugia.Es por esto por lo que en una época relativamente temprana se esboza lo que posteriormente será la cirugia rehabilitadora.Así en 1896 FOEDERL intenta restablecer la funcionalidad suturando el primer anillo traqueal a la base de la lengua,técnica que desarrollaron más tarde SERAFINI y ARSLAN.De esta forma la cirugia de exéresis comienza a dar paso a la cirugia funcional con lo que se pretende no sólo la curación del paciente sino el restablecimiento de la voz.Esta cirugia tiene su máximo exponente en KLUISKENS (1969) con el primer y único caso documentado de transplante de laringe.Como consecuencia de la inmunodepresión secundaria al tratamiento el paciente falleció con una carcinomatosis generalizada.

Mención especial en cuanto a la cirugia funcional se refiere merece el capitulo referente al inicio en 1947 por J.M. ALONSO de la laringectomia horizontal supraglótica.Este autor concibe la idea de la exéresis,siempre que sea posible, de la región supraglótica en la que asienta el tumor respetando el resto de la laringe por lo que su funcionalidad,aunque mermada, no se pierde de forma completa.Ya en 1909 FRAZIER afirma que las estructuras de la supraglotis derivan embriológicamente de la bolsa bucofaringea (arcos III y IV) mientras que la glotis y la subglotis derivan de la bolsa pulmonar (VI arco branquial).La laringe tiene por tanto dos sistemas linfáticos diferentes que se corresponden con componentes embriológicos distintos.BACLESSE (1939) en su libro "Le diagnostique radiologique des tumoeurs malignes du pharynx" refiriendose a los tumores vestibuloepiglóticos indica que aunque pueden adquirir dimensiones considerables "generalmente no alcanzan el nivel de la glotis deteniéndose en el techo del ventrículo de MORGAGNI".El propio J.M. ALONSO reconoce haberse basado en los estudios de BACLESSE siendo méritos indiscutiblemente suyos la concepción de la idea y el desarrollo de la técnica quirúrgica.

El estudio de las metástasis cervicales es de una gran importancia para el conocimiento completo de la patologia de los tumores de cabeza y cuello en general y de laringe en particular.Este estudio,sin embargo,no se generaliza hasta que la técnica del vaciamiento cervical pudo desarrollarse a principios del siglo XX.Fue CRILE (1906) quien en sus tratamientos comienza a realizar la resección en bloque del tejido linfático cervical,bien en la misma intervención que el tumor primario,bien en una intervención secundaria.Es 38 años más tarde cuando SILVESTRE BENIS (1944) extirpa en monobloque la lesión primaria junto con su envoltura linfática y de este modo preconiza el

vaciamiento simultaneo unilateral o bilateral junto a la laringectomia total en los casos que presentaban ganglios linfáticos palpables.En 1951 HAYES MARTIN presentó una casuistica de 1450 casos de vaciamiento cervical que tuvo una gran influencia en la definición de la técnica del vaciamiento radical.MARTIN no aconseja en cambio el vaciamiento profiláctico.Un año más tarde OGURA y BELLO preconizan la laringectomia y el vaciamiento según MARTIN con ganglios palpables o sin ellos y en una sola intervención.

De innovadora en este campo puede considerarse la aportación de O. SUAREZ (1963).Este autor extirpa los compartimentos aponeuròticos del cuello conservando las estructuras musculares y vasculonerviosas,es decir, convierte el vaciamiento radical de MARTIN,cuando es posible,en un vaciamiento radical midificado más anatómico y conservador.

Como sucede en otras ocasiones los trabajos de SUAREZ no son internacionalmente conocidos hasta 1967 gracias a la publicación de la casuistica de BOCCA y PIGNATARO que desde un principio atribuyeron la paternidad de la técnica al Dr. SUAREZ.

De la lectura atenta de esta breve introducción histórica puede desprenderse que la laringologia clínica sólo tiene auténtico caracter de ciencia en la segunda mitad del siglo XIX al tomar como base el conocimiento anatomopatológico de sus lesiones.

1-3.-EMBRIOLOGIA DE LA LARINGE.

Los primeros indicios del sistema respiratorio aparecen alrededor de la tercera semana de vida en el embrión de 1'5-2'5 mm.El intestino anterior en su lado ventral se relaciona con el techo del saco pericárdico y más caudalmente con el septum transversum.En estos lechos mesodérmicos se observan dos depresiones que constituyen la hendidura laringotraqueal,primordio de los divertículos traqueal y pulmonar y el divertículo hepático,primordio del hígado y vesícula biliar.Por fuera,el intestino anterior linda con una gruesa pared mesodérmica donde se desarrollan los arcos branquiales o faríngeos.

La hendidura laringotraqueal se encuentra situada inmediatamente por debajo de la cuarta bolsa branquial.

En el suelo faríngeo y entre el tercer y cuarto arco branquial se observa una eminencia de forma ovoidea denominada eminencia hipobranquial o masa central de FRAZIER constituida fundamentalmente por un engrosamiento de la porción anterior del cuarto arco.Poco después la eminencia hipobranquial aparecerá dividida en dos porciones por un surco horizontal en su zona media.La mitad anterior formará parte,junto con el tubérculo impar,del tercio posterior de la lengua,la mitad posterior constituirá la epiglotis siendo el surco horizontal un esbozo de la futura vallecula glosoepiglótica.

Las paredes laterales de la hendidura laringotraqueal están formadas por unos engrosamientos mesenquimatosos denominados por FRAZIER eminencias laterales,que en este estadio ocluyen por completo su luz.Se acepta generalmente

que las eminencias laterales proceden del sexto arco branquial y de ellas se originarán los botones aritenoideos.

En estudios más avanzados correspondientes al embrión de 8mm el primordio laringeo se encuentra rodeado por las bolsas endodérmicas y así la segunda bolsa rodea la eminencia hipobranquial,la tercera se situa craneal a la eminencia aritenoidea y la cuarta,caudal a esta.

Alcanzados los cincuenta dias de desarrollo fetal que corresponden a un embrión de 23mm existen indicios de los distintos elementos cartilaginosos que formarán el esqueleto laringeo.El cartílago tiroides,constituido en este estadio por dos grandes láminas laterales aún separadas por su extremidad anterior procederá del cuarto arco.El cartílago cricoides,procedente del sexto arco,presenta una forma distinta a la definitiva.

Según WIND (1970) el cricoides rodea completamente el borde superior de la traquea,mientras que para LARDI (1963) este cartílago aún no presenta su característica forma circular y en anillo de sello sino que tan solo está representado en su mitad posterior alcanzando tal dimensión que su altura es superior a la de la totalidad de la laringe.En cuanto al aritenoides se cree originado a partir del sexto arco como el cricoides, estando tan solo representado por unos pequeños cuerpos ovales de tejido precartilaginoso que se cree constituyen la apófisis vocal situada medialmente con relación al resto de las masas o eminencias aritenoideas.

La vallecula glosoepiglótica y la epiglotis son facilmente reconocibles .Lateralmente entre las masa aritenoideas y la epiglotis comienzan

a distinguirse los pliegues aritenoepiglóticos.Los pequeños cartilagos corniculados y cuneiformes se localizan ventral y cranealmente con respecto a las masas aritenoideas.

En este estadio toda la musculatura intrinseca de la laringe se encuentra perfectamente constituida aunque con escaso desarrollo del tiroaritenoideo.

La luz laringea que hasta entonces se encontraba ocluida por una lámina epitelial y el gran tamaño de las masas aritenoideas se hace permeable por la disminución de estas y la reabsorción de aquellas.

La cavidad laringea en su mitad inferior o conducto cricoideo tiene ahora la forma de una hendidura sagital rectilinea mientras que en su mitad superior en virtud de la formación de una porción transversa o vestibular adopta la forma de una T en cuyos ángulos se colocan los espesamientos vocales.

En el embrión de 90 dias (47mm aproximadamente) la morfologia general de la laringe se asemeja bastante a la postnatal.En lo referente al esqueleto cartilaginoso el tiroides fusiona sus alerones laterales a través de una pieza intermedia,el cricoides muestra una forma similar a la del adulto,en enillo de sello aunque en su borde superior ventral existe una profunda depresión y los aritenoides muestran su morfologia definitiva con sus dos apófisis vocal y muscular.

En este estadio fetal la cavidad laringea se incrementa gradualmente como resultado de

la reducción paulatina del tamaño de las masas aritenoideas así como del ensanchamiento del cricoides.

Comienzan a visualizarse los ventrículos de MORGAGNI como unas pequeñas invaginaciones localizadas ventral lateral y algo caudalmente a los aritenoides.

En los estadios siguientes a los 90 dias de gestación se asiste a una conformación y acoplamiento de todos los elementos laríngeos hasta llegar a constituirse de forma muy similar a la del adulto.

Como resumen de este breve estudio cabe resaltar el hecho del distinto origen embriológico de la supraglotis (arcos III y sobre todo IV) y la región glotosubglótica (procedente del VI arco) se comprende,por tanto,que el drenaje linfático de una y otra región sean también independientes.Este hecho puede considerarse de vital importancia para comprender el comportamiento de los tumores de asiento laringeo y el porqué de ciertos tipos de resección parcial en la cirugia de este órgano.

1-4.-ANATOMIA LARINGEA APLICADA.

La laringe es un órgano hueco de forma prismátoco triangular que corona la traquea a modo de capitel.

Se encuentra limitada por delante por la musculatura prelaringea,tejido celular subcutaneo y piel,por detrás por la faringe,por arriba por el cuerpo del hueso hioides y base de la lengua y hacia abajo por los primeros anillos traqueales.Proyectada sobre la columna cervical abarca desde la cuarta a la séptima vértebra,siendo su situación algo más baja en el hombre que en la mujer y el niño.Sometida a influjo hormonal su tamaño constituye un caracter sexual secundario.

Está constituida por un esuqeleto cartilaginoso funcionalmente útil que le da solidez y flexibilidad a la vez que sirve como punto de anclaje a la musculatur tanto intrínseca como extrínseca.

Este esqueleto cartilaginoso está constituido por tres cartílagos impares y medios:tiroides,crocoides y epiglotis y por tres pares de cartílagos situados simétricamente a ambos lados de la linea media:aritenoides,corniculados de SANTORINI y cuneiformes de WRISBERG.El cartílago cricoides,tiroides y aritenoides excepto en su proceso vocal están formados por tejido hialino mientras que el proceso vocal del aritenoides,los corniculados,cuneiformes y epiglotis son de naturaleza elástica.De ellos sólo los constituidos por tejido hialino pueden osificarse.Este proceso de osificación suele comenzar a los veinte años de edad para concluir alrededor de los cincuenta,siendo más rápido en el varón.

A diferncia del resto,el cartílago epiglótico es el único que presenta perforaciones u oquedades,muchas de ellas ocupadas por glándulas mucosas que sirven como via de comunicación entre su cara posterior o laringea y su cara anterior en íntima relación con el espacio preepiglótico.

Todos los cartílagos laríngeos están recubiertos por pericondrio,tejido rico en fibras colágenas y fibroblastos,excepto en el tiroides a nivel de la comisura anterior.Dicho pericondrio es considerado como una eficaz barrera defensiva frente a la invasión tumoral del cartílago ,que cuando sucede suele ocurrir en aquellas zonas que han sufrido metaplasia osea fisiológica (TUCKER 1963).

La cavidad de la laringe está abierta a la faringe y la traquea.Se divide en tres compartimentos:glótico,supraglótico y subglótico.La glotis está formada por las cuerdas vocales,la comisura anterior y la comisura posterior.El espacio triangular existente entre las cuerdas vocales se denomina apertura glótica o "rimma glotidis".Los dos tercios anteriores de las cuerdas,llamados porción membranosa, se insertan en la linea media del cartílago tiroides a través de la comisura anterior.La inserción de la comisura anterior se encuentra a medio camino entre el fondo de la escotadura del tiroides y la parte inferior de dicho cartílago en la linea media.Las porciones membranosas de las cuerdas están formadas enteramente por tejido blando:los ligamentos vocales cubiertos por mucosa y las fibras del tiroaritenoideo.

REINKE demostró mediante inyección submucosa la existencia de un espacio que puede distenderse y que estaria delimitado por dos lineas paralelas al borde de la cuerda:la mucosa con su lámina elástica subyacente y el ligamento vocal.A

este espacio se le denomina espacio linfático de la cuerda.

El tercio posterior de las cuerdas vocales está formado por la apófisis vocal del aritenoides recubierta de mucosa.La parte de la glotis que comprende los tercios posteriores de ambas cuerdas y la comisura interaritenoidea es la comisura posterior.

La supraglotis comprende los ventrículos de MORGAGNI,bandas ventriculares,cara laringea de epiglotis y los repliegues aritenoepiglóticos así como la zona de mucosa supraglótica que cubre los aritenoides y se extiende desde las bandas ventriculares hasta los repliegues aritenoepiglóticos.

El aditus laringeo es la apertura de la laringe en la hipofaringe y por tanto está integrado por los márgenes del vestíbulo laringeo.Esta apertura tiene una forma ovoidea con su parte más ancha delante.Está formada por el borde libre de la epiglotis por delante y lateralmente por los repliegues aritenoepiglóticos.A ambos lados del borde libre de la epiglotis surgen unas formaciones ligamentosas prominentes que van a servir para delimitar la orofaringe de la hipofaringe,son los repliegues faringoepiglóticos que marcan el límite entre la vallecula glosoepiglótica y el seno piriforme.El repliegue faringoepiglótico se dirge hacia delante y hacia la lainea media para reunirse con otro repliegue:el glosoepiglótico lateral.A la confluencia de ariepiglótico,faringoepiglótico y glosoepiglótico lateral se le denomina zona de los tres repliegues.

El vestíbulo laringeo es más ancho y

alto por delante que por detrás,se abre hacia atrás a la hipofaringe,recibiendo dicha apertura el nombre de "aditus laringis".El vestíbulo laríngeo queda limitado hacia arriba por el borde libre de la epiglotis que se prolonga hacia atrás y a ambos lados por los repliegues aritenoepiglóticos,terminando en los aritenoides.El límite inferior queda constituido por la hendidura que forman los bordes libres de ambas bandas ventriculares.

Podemos distinguir en el vestíbulo laríngeo cuatro paredes:la anterior comprende la cara laríngea de la epiglotis llegando por debajo hasta el tubérculo de CZERMACK;las paredes laterales están formadas por la cara superior de ambas bandas que llegan hasta el "philtrum ventricular" que cierra el límite posterior de estas paredes;la pared posterior comprende el espacio interaritenoideo limitado por la cara interna de los aritenoides a uno y otro lado respectivamente.

Las bandas tienen forma imprecisa, son menos salientes medialmente y más cortas que las cuerdas,no tienen coloración nacarada y se insertan en el ángulo tiroideo por delante,se van separando de delante hacia atrás para terminar en la cara anterior del cartílago aritenoides.Su cara superior está ligeramente abombada en su parte anterior y deprimida en la posterior.A este nivel existe un pequeño surco,el "philtrum ventriculi" de MERCKEL que marca los límites entre la pared posterior y lateral del vestíbulo.

El ventrículo de MORGAGNI es una hendidura de eje mayor anteroposterior de forma oblongada situado entre la cuerda y la banda cuyas paredes están tapizadas por una mucosa muy gruesa.Su techo está formado por la cara inferior de la banda ventricular y el suelo por la cara superior de la

cuerda vocal.Su pared externa está en íntimo contacto con el pericondrio interno del ala tiroidea,explicándose así la afectación cartilaginosa casi rutinaria por las neoplasias que se situan en esa zona.

El ventrículo es más grande en el hombre que en la mujer,lo que parece explicar la rareza de los laringoceles en el sexo femenino.Existe una prolongación superior y anterior en dedo de guante,que pasando por detrás de la banda llega hasta el borde superior del ala tiroidea,a esa prolongación se la denomina bursa de MERCKEL y seria un vestigio de las bolsas aereas de ciertos primates.

La región subglótica empieza aproximadamente 5mm por debajo del borde libre de las cuerdas y se extiende hasta el borde inferior del cartílago cricoides.Consiste en una mitad superior móvil y otra mitad inferior inmovil.La porción superior está formada por la mucosa del cono elástico que cubre el músculo tiroaritenoideo.La motilidad corre a cargo de los músculos que producen abducción o aducción de las cuerdas.

Durante la fonación la mitad superior de la región subglótica toma la forma de arco gótico.La mitad inferior o parte fija del espacio subglótico está recubierta por la mucosa de la cara interna del cartílago cricoides.La unió de las dos partes se encuentra a un centímetro por debajo de las cuerdas coincidiendo con la membrana cricotiroidea.

1-4-1.-Anatomia microscópica de mucosa y submucosa.

Histológicamente la mucosa de la región

supraglótica y subglótica están cubiertas por epitelio
pseudoestratificado de tipo respiratorio,mientras que en la región glótica el epitelio es poliestratificado plano no queratinizado.

En la submucosa de las regiones suprglótica,glótica y ventricular pueden hallarse glándulas seromucosas especialmente abundantes en las bandas,donde puede encontrarse además cierta cantidad de tejido graso y algunas fibras musculares a las que TUCKER (1963) denomina músculo ventricular.

En diversos territorios laringeos pueden observarse foliculos linfoides de aspecto en todo semejante a los que integran la amigdala faringea con un centro claro y una corona más o menos marcada.Estas formaciones constituyen la amigdala laringea de situación variable pero casi siempre localizada en la cavidad ventricular.

1-4-2.-Compartimentación laringea.

De especial interés dentro del capítulo de
anatomia laringea es el conocimiento de lo que se ha dado en
llamar compartimentación laringea.Bajo la mucosa la estructura laringea puede considerarse constituida por cartílagos unidos entre si mediante ligamentos intrínsecos.Estos ligamentos forman parte de una amplia red de tejido fibroso con abundantes fibras elásticas que está bien desarrollado en algunas zonas y es menos evidente en otras.

Nuestros conocimientos actuales sobre el tema se basan fundamentalmente en los estudios

llevados a cabo por PRESSMAN a finales de los años cincuenta y TUCKER a principios de los sesenta.Sin embargo los resultados aportados por estos autores,a los que poco ha podido añadirse,no son más que el fruto de investigaciones iniciadas casi doscientos años antes.

Ya MORGAGNI (1682-1771) hace referencia a las dificultades que para los clínicos de la época representa el diagnóstico diferencial entre "sofocación" y "apoplejia".Sus estudios sobre material de autopsia le permiten llegar a la conclusión de que la retención de líquido intercelular y el edema de la laringe pueden considerarse la causa de la muerte por sofocación.

Mas tarde BICHAT (1771-1802) lleva acabo un curioso experimento en perros:coloca un cuerpo extraño en la epiglotis del animal comprobando al poco tiempo la existencia de un edema que fácilmente se extiende a los repliegues aritenoepiglóticos,semejante al producido en humanos.

A partir de 1800 el edema inflamatorio de laringe es motivo de discusión entre anatómicos y clínicos durante más de doscientos años.

En 1852 SESTIER liga la carótida externa izquierda e introduce agua a presión por la carótida derecha en laringes de cadáveres consiguiendo un edema generalizado de las superficies internas y externas que no permite una descripción detallada de los distintos compartimentos laringeos.

Más tarde HAJECK (1891) estudiando el material de 132 autopsias de pacientes muertos por sofocación inyecta colorante en distintas regiones de

la superficie interna de la laringe precisando ciertas zonas edematosas o "bursas",término que implica la existencia de un espacio submucoso limitado en cuanto a tamaño,configuración y localización anatómica.Este autor presta una gran atención a la epiglotis,pliegue ariepiglótico e hipofaringe como zonas de localización de edema.Menciona la "bursa de MORGAGNI" pero le da escasa importancia como causa de obstrucción laringea.Se da cuenta de que el edema puede permanecer localizado en cada una de estas regiones sospechando barreras anatómicas fibrocartilaginosas que interfieren la extensión a la subglotis de los edemas localizados en la supraglotis y biceversa.

Más recientemente PRESSMAN (1956) mediante la inyección de colorante azul como hiciera HAJECK sugirió la división de la laringe en el plano sagital en dos hemilaringes y cada una de ellas a su vez en supraglotis,subglotis,banda ventricular y espacio epiglótico de la linea media o espacio preepiglótico.Describe además la llamada por TUCKER area cricoidea de PRESSMAN localizada entre la mucosa subglótica por dentro,el pericondrio interno del cricoides por fuera y el músculo tiroaritenoideo y cricoaritenoideo lateral por arriba,sobre la inserción cricoidea del ligamento cricovocal.

En 1961 TUCKER desarrolló una técnica para la sección seriada de toda la laringe que permite un estudio cuidadoso de las relaciones ligamentosas,cartilaginosas y mucosas que se encuentran en el interior de este órgano.Estas estructuras de tejido conectivo forman barreras que dividen la laringe en varios compartimentos que teóricamente podrian limitar la extensión tumoral.

Para la descripción de los mismos se han seguido

básicamente las investigaciones de esta autor.

1-4-2-1.-Ligamentos intrinsecos.

El cono elástico o membrana cricovocal se extiende desde el borde superior del cricoides hasta el ligamento vocal y se compone principalmente de tejido elástico.La porción anterior se une al ligamento cricotiroideo medio en la linea media del cartilago tiroides y va hasta la apófisis vocal de los aritenoides.Los bordes superiores engrosados del cono que se extienden desde la comisura anterior hasta la apófisis vocal son los ligamentos vocales,que se unen al tiroides por el tendón de la comisura anterior el cual está constituido por una banda de tejido fibroso que contiene vasos sanguineos y linfáticos.

En la zona del ventriculo el tejido elástico es menos evidente excepto en una capa relativamente gruesa que se extiende desde los bordes laterales de los ligamentos vocales hasta el pericondrio interno del tiroides,es el ligamento tirovocal.Esta estructura bajo el suelo del venticulo corresponde aproximadamente a la división entre las porciones glótica y supraglótica.De esta forma,si se admite la existencia del ligamento tirovocal,la región glótica puede considerarse encapsulada entre este ligamento por arriba,el ligamento cricovocal por abajo y el ligamento vocal propiamente dicho en la linea media.En este espacio estarian contenidas las fibras de los músculos tiroaritenoideo medial y lateral.

Los ligamentos cuadrangulares se insertan por delante de los bordes laterales de la epiglotis y se extienden por cada lado por detrás de la cara interna de los aritenoides.Las fibras que constituyen el ligamento o lámina cuadrangular se

continuan por arriba con los repliegues ariepiglóticos y hacia abajo con los ligamentos ventriculares que siguen una dirección paralela a los vocales pero situados en el techo del ventrículo de MORGAGNI.

Por último TUCKER (1971) admite la existencia del ligamento hioepiglótico que por arriba forma parte del techo del espacio preepiglótico pero que lateralmente se dirige desde el hioides a los bordes laterales de la epiglotis separando de esta forma el espacio preepiglótico del paraglótico.En las secciones coronales el ligamento hioepiglótico parece continuarse en ocasiones con la lámina cuadrangular.

1-4-2-2.-Compartimentos laringeos.

En una sección de la laringe en el plano frontal pueden distinguirse:

-espacio de REINKE situado entre la mucosa de la cuerda vocal y el ligamento vocal.

-el area supraglótica entre la mucosa de la supraglotis y la lámina cuadrangular

-el area subglótica,espacio situado entre la mucosa subglótica y el cono elástico ocupado por tejido fibroelástico.El area subglótica está limitada por arriba por la comisura anterior y por el tendón de la comisura anterior.

-area cricoidea de PRESSMAN descrita anteriormente.

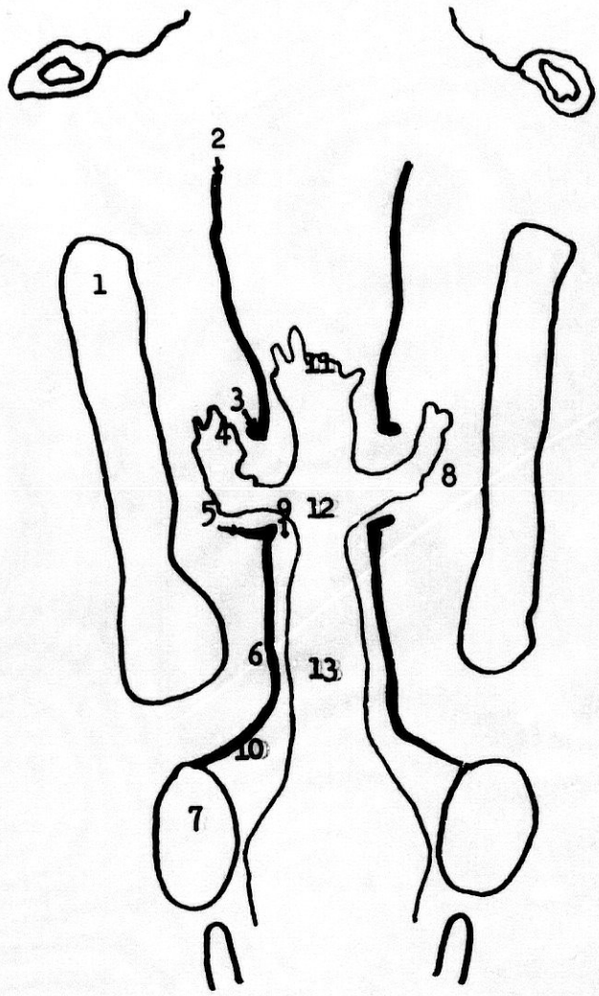
-espacio paraglótico limitado en la supraglotis lateralmente por el pericondrio interno del tiroides y medialmente por la lámina cuadrangular y en la subglotis lateralmente por la membrana cricoidea y el pericondrio interno de la porción

inferior del tiroides y medialmente por el cono elástico(Esquema 1).

La mucosa del ventrículo se comunica directamente con el espacio paraglótico.El espacio paraglótico,por encima del ventrículo está separado por la lámina cuadrángular del espacio suprglótico y por el cono elástico y el cricoides del espacio subglótico y cricoideo de PRESSMAN respectivamente.El límite posterior del espacio paraglótico es la mucosa del seno piriforme.

Se admite generalmente que el espacio paraglótico se continua hacia delante con el preepiglótico y de arriba hacia abajo se extiende desde el area suprglótica a la subglotis pasando lateralmente al músculo tiroaritenoideo.Estas afirmaciones entran en abierta contradicción con la descripción por TUCKER (1971) de los ligamentos hioepiglótico y tirovocal a los que se ha hecho referencia anteriormente.

-espacio preepiglótico,limitado por arriba y lateralmente por el ligamento hioepiglótico por delante por la membrana tirohioidea y la porción superior del tiroides y por detrás por la epiglotis y el ligamento tiroepiglótico.Contiene grasa y tejido areolar.El nombre de espacio tirohioepiglótico es debido,al igual que los actuales límites a POIRIER y PIQUET.Estos autores lo han descrito subdividido en dos compartimentos laterales,circunstancia plenamente de acuerdo con los hallazgos operatorios de invasión estrictamente unilateral.GERRIER y ANDRE (1964) demostraron la división del espacio preepiglótico en dos mitades por un tabique medio y vertical al que denominaron tabique preepiglótico vertical.Fue erroneamente llamado por ORTON (cit. SILVER 1985) bolsa de BOYER.De acuerdo con TUCKER (1971) BOYER describió una bolsa pretirohioidea limitada por delante por el músculo tirohioideo,por detrás por la



ESQUEMA 1

1)Cartilago tiroides 2)membrana cuadrangular 3)ligamneto ventricular 4)ventriculo 5)ligamento vocal 6)cono elástico 7)cricoides 8)espacio paraglótico 9)espacio de Reinke 10)area cricoidea de PRESSMAN 11)supraglotis 12)glotis 13)subglotis.

membrana tirohioidea,por arriba por el ligamento hioepiglótico y por debajo por el borde superior del cartílago tiroides.La bolsa de BOYER se situa,por tanto, delante del espacio preepiglótico.

Anatómicamente existe una continuidad tanto en el plano horizontal como en el vertical de la mucosa y submucosa de los espacios supraglótico,glótico y subglótico.Funcionalmente en cambio,y aunque esta continuidad no se interrumpa de forma completa,si puede considerarse la presencia de una barrera glótica como lo demuestra el retraso de la progresión del contraste inyectado en la submucosa (WELSH 1983).

Pero si bien el componente fibroelástico va a desempeñar un importantísimo papel en el desarrollo evolutivo del cancer laringeo dentro de las distintas regiones que lo componen,va a ser el componente linfático el responsable primordial de su propagación hacia el exterior y concretamente hacia las cadenas ganglionares cervicales.

1-4-3.-Drenaje linfático.

Para SILVER (1985) los linfáticos superficiales pueden clasificarse en un grupo superficial o intramucoso y otro profundo o submucoso.Los linfáticos superficiales formarian una red que se extiende por toda la superficie mucosa sin compartimentación.Por el contrario los linfáticos profundos de cada hemilaringe serian independientes sin interconexión entre los dos lados.A traves de estos linfáticos profundos el drenaje tiende a ser predominantemente ipsilateral excepto en los niveles más bajos del area subglótica.Para WELSH (1983) en cambio,sólo existiria una red linfática submucosa a la que llama superficial para distinguirla de los colectores profundos de mayor grosor,que vehiculizan

la linfa de esta red superficial a los ganglios profundos del cuello.Mediante la inyección de colorante en la submucosa se comprueba que esta red linfática superficial no se interrumpe continuándose los linfáticos de un lado con los del otro a través de la linea media.Tras la inyección de material radiactivo (Au 198),por el contrario,observa que el drenaje linfático es fundamentalmente ipsilateral,llegando a la conclusión de que no existe una barrera anatómica entre los linfáticos superficiales de ambos lados pero si una barrera funcional como lo demuestra el hecho de que ante la imposibilidad de un drenaje ipsilateral (vaciamiento,interrupción de los colectores linfáticos por tumores tiroideos,patologia linfática tumoral,infección o radioterapia) la hemilaringe de un lado drena su linfa en los ganglios cervicales contralaterales.

La red linfática intralaringea puede dividirse en suprglótica e infraglótica llamando la atención la práctica ausenciade vasos linfáticos en la región glótica.Los linfáticos supragloticos son de mayor grosor y más abundantes que los subgloticos constituyendo una tupida malla más evidente a nivel del ligamento tiroepiglótico e inmediatamente por debajo de él.Los sistemas linfáticos supraglótico y subglótico son prácticamente independientes existiendo una discreta comunicación a través de la comisura posterior.

Los capilares de la región suprglótica salen de la laringe por medio de unos colectores que suelen ser unos cinco o seis,situados en la parte anterior del repliegue ariepiglótico.A este nivel se van a unir con los procedentes del seno piriforme y de la pared posterior de la faringe,que a su vez forma dos o tres troncos reunidos en la parte alta y delantera del citado seno.Una vez reunidos todos los colectors de la porción supraglótica,del seno y de la

pared posterior de la faringe van a atravesar la membrana tirohioidea por el mismo orificio que los vasos y nervios laringeos superiores.El número de troncos linfáticos a este nivel se encuentra ya reducido a dos o tres vasos de mayor calibre .De entre ellos uno se dirige hacia arriba siguiendo el asta mayor del hueso hioides para terminar generalmente en un ganglio subdigástrico.Los restantes vasos de la región se dirigen transversalmente hacia los ganglios que rodean el tronco tirolinguofacial o bien oblicuamente hacia abajo y afuera hacia los ganglios de la cadena yugular interna en el espacio comprendido entre el citado tronco y el músculo omohioideo .

Los linfáticos de la región subglótica son muy distintos de los anteriores ya que van a formar en su reunióm tres pediculos,uno anterior y dos posteriores.El anterior según ROUVIERE drenaria la mitad anterior de la subglotis y estaria formado por cuatro o cinco troncos que atraviesan la membrana cricotiroidea y caminando por encima o por debajo de la inserción tiroides del músculo esternotiroideo terminan en la cadena yugular interna.Otras veces estos colectores finalizan en los ganglios intercricotiroideos o prelaringeos de POIRIER para dirigirse desde aquí bien a los linfáticos de la cadena yugular interna o bien a los ganglios pretraqueales caminando por el istmo del tiroides.De aquí resulta la posible afectación tumoral de esta glándula en las neoplasias de la región subglótica.Los otros dos pediculos posteriores estarian formados por dos o tres vasos bilaterales que atraviesan la membrana cricotiroidea y se dirigen a ls cadenas recurrenciales correspondientes.

Según WELSH (1983) tras la inyección de material radiactivo de las regiones glotosupragloticas,subglótica y espacio paraglótico la mayor parte de la radiación se detecta a la altura

de los grupos ganglionares superiores y medio de la cadena yugular profunda,por lo que concluye que la dirección del drenaje linfático de toda la laringe tiende a ser ascendente.

1-5.-ANATOMIA PATOLOGICA DEL CANCER LARINGEO.

1-5-1.-Transformación maligna.

El epitelio de revestimiento laringeo es poliestratificado plano no queratinizado en el borde libre de la cuerda vocal y pseudoestratificado de tipo respiratorio con abundantes estructuras glandulares a nivel del estroma,a nivel supraglótico y subglótico.

El epitelio poliestratificado plano de la cuerda consta de una capa superficial de células planas,una o varias capas de células intermedias y una capa basal de células cuboides.

Si consideramos la transformación maligna como un proceso biológico más y no como un salto brusco a partir de un epitelio normal,hemos de admitir la existencia de estadios intermedios a través de los cuales un epitelio sano puede transformarse en otro neoplásico.

Desde este punto de vista la secuencia de acontecimientos podria ser la siguiente;ante ciertos estímulos el epitelio pavimentoso puede sufrir una hiperplasia,generalmente con acantosis o aumento del número y tamaño de las papilas epiteliales,y/o metaplasia cornea o hiperqueratosis,la cual a su vez puede ser ortoqueratósica si el citoplasma de la célula superficial se llena por completo de queratina sustituyendo cualquier estructura celular,o disqueratósica.La forma más frecuente de disqueratosis es el mantenimiento del nucleo celular en las capas más superficiales de células querastinizadas,fenómeno que se conoce con el nombre de paraqueratosis.

La transformación del epitelio pseudoestratificado sigue los mismos pasos descritos hasta ahora para el poliestratificado plano,ya que puede transformarse en éste mediante el fenómeno de metaplasia epitelioidatosa.De esta forma tanto a partir de uno como de otro tipo epitelial puede llegarse al epitelio malpigiano constituido fundamentalmente por un estrato germinativo basal,varias capas del estrato espinoso,estrato granuloso y estrato corneo,más superficial.

A partir de un epitelio hiperplasico con acantosis marcada y con o sin metaplasia cornea,puede surgir la displasia.Se entiende por displasia la aparición de atipias y aumento en el número de mitosis.Si la displasia afecta a los estratos más basales se denomina displasia leve,moderada si llega a los intermedios y grave si afecta a todo el epitelio en cuestión.La diferenciación entre displasia grave y carcinoma "in situ" no siempre es posible.Cuando algunos cordones celulares rompen la membrana basal estamos ante un carcinoma microinvasor.

1-5-2.-Clasificación de lesiones premalignas.

En los últimos años se ha propuesto la clasificación de las lesiones premalignas tomando como base exclusivamente los hallazgos histológicos.Entre las más cualificadas pueden considerarse las propuestas por KLEINSASSER (1962),WEIS (1961) y LEPANGE (1965).De ellas es la de KLEINSASSER (1962) la que más claramente expone las posibilidades evolurivas de una lesión benigana hasta su transformación en maligna.

Según este autor las lesiones precancerosas pueden agruparse en tres grandes grupos atendiendo a las modificaciones acontecidas en los distintos estratos celulares que constituyen la mucosa laringea.

El grupo I también llamado hiperplasia epitelial simple,viene caracterizado por una multiplicación celular y un aumento del grosor epitelial sin experimentar cambio en su constitución interna,que sigue siendo regular,ni en su estratificación celular,aunque en ocasiones se observa,dada la hiperactividad del estrato basal una discreta pérdida de su ordenación a este nivel.No existe atipia celular ni mitótica aunque sí metaplasia cornea.

El grupo II o hiperplasia epitelial con atipias celulares aisladas se caracteriza por existir dentro de una hiperplasia simple algunas atipias,tanto a nivel nuclear (hipercromatismo) como celular (alteración en su morfologia).

El grupo III denominado por KLEINSASSER (1962) epitelio precanceroso y por WEIS (1961) epitelio atípico,incluye todas las alteraciones celulares que se advierten en el carcinoma clásico,pero sin que sea demostrable un crecimiento invasor con ruptura de la membrana basal.Dentro de este grupo se incluyen los llamados carcinomas"in situ",lesión en la que junto a una integridad de la membrana basal existen alteraciones a nivel celular tales como hipercromatismo,numerosas mitosis más o menos anormales y monstruosidades celulares que hacen pensar en su próxima transformación en un carcinoma invasor (DEROUT 1964).

El término de carcinoma "in situ" fue

usado primariamente por BRODERS para definir un estadio preinvasivo del carcinoma intraepitelial,aunque fue OWEN (1912) quien preconizó la naturaleza potencialmente maligana de esta lesión.

Desde entonces múltiples han sido los trabajos relacionados con el tema siendo interesantes los de BAUER (1972) quien llamó la atención sobre la gran frecuencia,un 78%,con que un carcinoma"in situ"aparece asociado a un carcinoma invasor,situándose aquel dentro de un area cuyo epicentro es éste.Este autor afirma que el hallazgo de un carcinoma "in situ" como única lesión aparecida a nivel de la mucosa laríngea es raro,representando sólo un 1'3%.MILLER (1953) encuentra sólo 13 casos de carcinoma "in situ" en cinco años.Para ambos autores dicha lesión se halla principalmente a nivel de la cuerda vocal.

Según BARTUAL (1969) el carcinoma "in situ" no es más que un cancer incipiente,no una lesión precancerosa y representa un estadio evolutivo intermedio entre la lesión precancerosa y el cancer invasivo propiamente dicho,coincidiendo con éste en las atipias celulares y con aquel en la conservación de la membrana basal.

DIAZ (1974) confirma la indemnidad de la membrana basal estudiando ultraestructuralmente biopsias de lesiones precancerosas.Lo que caracteriza a estas lesiones es la desorganización y la desdiferenciación de las capas celulares sin existir alteraciones en todos los niveles del epitelio.Las células muestran nucleos hipercromáticos y aumentados de volumen siendo frecuentes las figuras de mitosis.

Para DEROUT (1964) la verdadera etapa precancerosa que precede a la aparición del carcinoma

"in situ" es una lesión indiferenciada,sin nombre propio,inmadura, en vias de proliferación activa y clínicamente muda.

Esta criterio es confirmado por WEILAND (1955) quien al irritar la mucosa laringea del animal de experimentación con benzopireno observa como el proceso de cancerización se hace por etapas discontinuas.Primero aparecen lesiones diferenciadas,maduras,con hiperqueratosis;después lesiones indiferenciadas,inmaduras consecuentes a un proceso de regeneración a partir de las capas germinativas de la mucosa para terminar finalmente en la aparición de un carcinoma.Este carcinoma ha destruido la membrana basal y penetrado en el tejido submucoso,con potencialidad para proseguir su marcha reproductiva e invasora dependiendo ambas tanto de la naturaleza del tumor como de su localización topográfica.

1-5-3.-Carcinoma invasivo.

La membrana basal puede describirse com una estructura acelular situada en el límite entre el epitelio normal y el estroma subyacente.Hasta ahora se considera que el paso de las células tumorales desde la región epitelial al estroma se produce sólo cuando estas son capaces de vencer la barrera que supone la membrana basal.De esta forma el carcinoma "in situ" se convierte en carcinoma microinvasor.Este concepto ha sido puesto en duda recientemente por CARTER (1985) quien mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas pone de manifiesto la presencia de colágeno tipo IV de la membrana basal normal alrededor de nidos celulares que con microscopia óptica aparecian en el estroma subyacente como claramente invasivos.En las metástasis linfáticas el hallazgo es similar.

Podria pensarse que también en los tumores invasivos existe un límite neto entre epitelio y tejido subepitelial,si no por una membrana basal completa sí por algún componente de la misma.Otra posible explicación es que en los tumores moderadamente y biem diferenciados las células de los estratos inferiores mantienen la capacidad . de síntesis de alguno de los componentes de su membrana basal.En los poco diferenciados sí son frecuentes los hallazgos de engrosamiento,duplicación y solución de continuidad del colágeno limitante a través de los cuales las células tumorales escapan al conjuntivo peritumoral.

1-5-4.-Clasificación histológica del carcinoma epidermoide laringeo.

Basándose en el grado de diferenciación celular BRODERS (1932) clasificó los carcinomas epidermoides en cuatro grandes grupos según la proporción de células bien diferenciadas.
En el grupo I se incluyen los que tienen más del 75% de células bien diferenciadas.En en el grupo II los de más del 50% de células bien diferenciadas y en los grupos III y IV los que poseen un 25% o menos ,respectivamente,de células diferenciadas.

En la actualidad esta clasificación ha caido en desuso siendo más empleada la propuesta por ALBERTINI (1955) en la que se clasifican los tumores epiteliales en bien diferenciados,moderadamente diferenciados,pobremente diferenciados e indiferenciados,atendiendo al grado de diferenciación global y no porcentual.

Teóricamente los tumores bien diferenciados tendrian menor poder de penetración en el estroma subyacente,baja capacidad metastatizante,una evolución más lenta y un

pronóstico mejor que los de menor diferenciación,sin embargo,la valoración del grado histológico del tumor en comparación con su comportamiento biológico global no siempre es unánime.

Para algunos el grado de diferenciación sería indicativo sólo del poder metastásico del tumor,en cambio no estaria relacionado con el tipo de crecimiento ni con la invasión del esqueleto cartilaginoso (KIRCHNER 1974).DELAHUNTY (1968) afirma por el contrario que el modo de crecimiento de la neoplasia está relacionado en parte con el grado histológico.Los pobremente diferenciados tendrian una capacidad invasiva mayor,siendo infiltrantes en casi todos los casos al contrario de lo que sucede en los bien diferenciados,que tienden a permanecer en su lugar de origen presentando un crecimiento vegetante.

Para BARTUAL (1969) existe una estrecha correlación entre el aspecto macroscópico del tumor,su localización y el tipo histológico.Según este autor,con bastante frecuencia el tumor vestibular es voluminoso ulcerado y necrosado como consecuencia de la poca resistencia a la progresión de la neoplasia,que es más rápida que su capacidad angiogénica por lo que los vasos sanguineos no son suficientes para asegurar la vitalidad tisular.Si por el contrario el tumor asienta en una zona en la que existen estructuras que oponen resistencia a su progresión,adopta un crecimiento excrecente con escasa infiltración y un tipo histológico bien diferenciado como ocurre a nivel de la región glótica.En los subglóticos por último,el tumor está dotado de un gran poder infiltrativo lo que le permite un extenso crecimiento sin apenas modificar el aspecto de la superficie mucosa siendo la mayoria de ellos histológicamente indiferenciados.

1-5-5.-Anatomía patológica macroscópica.

Según su aspecto externo los tumores laringeos pueden clasificarse en tres grandes grupos:exofíticos,ulcerados e infiltrantes (BARTUAL 1975).Los primeros crecen en forma vegetante haciendo prominencia en la luz laringea.En general son neoplasias de bajo grado de malignidad y con frecuencia persisten areas leucoplásicas en su superficie que unidas a la madurez de su crecimiento pueden plantear serios problemas en su diagnóstico si la biopsia no es lo suficientemente amplia y profunda.

Los tumores ulcerados poseen un crater central de aspecto necrótico y de bordes más o menos prominentes.Frecuentemente este tipo de tumor no es más que la consecuencia de la necrosis hisquémica de un carcinoma vegetante;en otras ocasiones por el contrario,el establecimiento de una ulceración depende de la gran capacidad infiltrante,que se traduce e una una invasión masiva del órgano.

Los carcinomas ulcerados predominan en la región vestibular y la cuerda vocal,no siendo raro que en el primero de los casos alcancen tamaños realmente grandes a diferencia de lo que ocurre en las ulceraciones de la región glótica que suelen ser de menor tamaño y con un reborde menos elevado.

Los tumores infiltrantes,ulcerados o no,son neoplasias de enorme capacidad proliferativa que crecen en profundidad invadiendo el corion y diseminándose por debajo de zonas de mucosa todavia intacta.En ocasiones se trata de tumores ulcerados situados en areas dificilmente accesibles como el ventrículo,pliegue ariepiglótico y seno piriforme.

Así como los tumores exofíticos traducian una mayor maduración del tejido neoplásico,los tumores ulcerados y especialmente los infiltrantes coexisten siempre con una maduración mucho más baja,que en los últimos suele ser inexistente.Esta relación entre capacidad madurativa y tipo de crecimiento matiza la evolución de cada caso y debe tenerse en cuenta con vistas al pronóstico.

El comportamiento de los tumores laringeos es muy variable desde el punto de vista biológico atendiendo fundamentalmente a su localización primaria.Clásicamente se considera a los tumores supragloticos,glóticos y subglóticos como entidades bien definidas con unas caracteristicas concretas que permiten la clara distinción de unos con respecto a los otros a pesar de su aparente homogeneidad histológica.Desde mediados de los años cincuenta además se presta una mayor atenciín a los tumores transglóticos como variedad anatomopatológica distinta.

En cada una de estas localizaciones suelen hallarse grandes diferencias macroscópicas histológicas y evolutivas que nos permiten predecir con bastante arpoximación sus futuras manifestaciones clinicas.

1-5-5-1.-Carcinomas supragloticos.

La mayor parte de los tumores supragloticos asientan en la cara laringea de la epiglotis.El carcinoma epiglótico puro representa una pequeña parte de los tumores de la laringe.Su aspecto externo es variable predominando las formas exofiticas de superficie rugosa.Histológicamente son más frecuentes los grados de madurez intermedia con capacidad queratoblástica moderada.

Dentro de la epiglotis es necesario separar los tumores de la región superior libre,que suponen aproximadamente un tercio de los casos de los de la inferior que constituyen los dos tercios restantes.

El carcinoma epiglótico alto difunde aprovechando la rica red linfática submucosa hacia ambos lados ,infiltrando los pliegues ariepiglóticos y hacia delante ocupando la vallecula glosoepiglótica y la base d la lengua.Desde la epiglotis los nidos carcinomatosas pueden extenderse en sentido distal a lo largo de la superficie cartilaginosa o pasar al espacio preepiglótico a través de pequeñas perforaciones existentes en el cartilago que normalmente están ocupadas por las glándulas mucosas.

Desde el espacio preepiglótico las neoplasias de los dos tercios inferiores de la epiglotis pueden llegar también a la vallecula y base de la lengua.

En la valoración de las vias de difusión del carcinoma epiglótico alto deben tenerse en cuenta en primer lugar el caracter bilateral de los linfáticos submucosos de la epiglotis que hacen posible una metástasis ganglionar de ambos lados y en segundo lugar la falsa barrera que representa a veces su cartílago,el cual resiste la invasión neoplásica durante algún tiempo pero por el que pueden pasar las células tumorales,bien a través de sus orificios como se ha citado anteriormente o bien bordeando su extremo inferior.

El segundo apartado incluye el carcinoma de bandas y base de la epiglotis que presenta caracteristicas histológicas diferentes con respecto a los epiglóticos altos.Las razones de su delimitación como grupo independiente son su

evolución diferente,su forma de diseminación y su valoración distinta en relación con la actitud quirúrgica a tomar.

Son tumores de menor grado de madurez histológica,más frecuentemente ulcerados que se extienden en superficie ocupando otras zonas dentro de la supraglotis,sobrepasando en ocasiones el pliegue ariepiglótico hasta llegar a la pared interna del seno piriforme o penetrando hacia delante en el espacio preepiglótico.

Los tumores del pie de la epiglotis ocupan el espacio preepiglótico en su totalidad mientras que los de las bandas tienden a infiltrar el espacio preepiglótico homolateral.Sea cual sea la localización inicial una vez que se ha alcanzado el espacio preepiglótico ,por la bilateralidad del sistema linfático laringeo superior las metástasis pueden aparecer en cualquiera de las dos cadenas cervicales.

La extensión hacia abajo de los tumores supragloticos se ve detenida a nivel de los ventrículos.En otros capitulos del presente trabajo se han analizado en detalle las bases anatómicas y embriológicas de este hecho (COUTARD 1927;LEROUX-ROBERT 1939;BACLESSE 1949;ALONSO 1951).La tendencia a permanecer limitado por encima de los ventrículos está relacionada con las características histológicas del tumor.

Una de las características morfológicas más significativas del carcinoma de laringe es el crecimiento en la periferia tumoral.Se distinguen principalmente dos tipos:tumor cuyo margen empuja y tumor cuyo margen infiltra.Los primeros se encuentran más frecuentemente en la supraglotis que

en cualquier otra localización.

Las lesiones supraglóticas exofíticas suelen quedar confinadas por encima del ventrículo y la comisura anterior,no invadiendo el cartílago tiroides.Hay poca tendencia a la invasión submucosa más allá de los límites de la extensión superficial visible.Por el contrario las lesiones ulcerativas se extienden con frecuencia distalmente a través de la comisura anterior o de la porción anterior del ventrículo.

Se ha comprobado una estrecha correlación entre el grado de diferenciación y el comportamiento del tumor supraglótico hasta el punto de contraindicar formalmente la cirugía conservadora en tumores muy indiferenciados.

Por último , las lesiones más laterales y posteriores de la supraglotis pueden extenderse hacia atrás hasta la mucosa del aritenoides,la invasión cartilaginosa ocurre sólo si hay una afectación extensa de la mucosa que cubre este cartílago.

1-5-5-2.-Carcinomas glóticos.

Es el carcinoma laríngeo más frecuente entre los anglosajones.Tiene un crecimiento lento y la mayor parte son bien diferenciados.Asientan preferentemente en la mitad anterior de la cuerda y la comisura enterior.La comisura posteriorse afecta más raramente.

Una vez establecido,desde su lugar de origen las lesiones se extienden en tres direcciones:el plano glótico,verticalmente y en profundidad.La extensión en el plano glótico ocurre

de forma radial,hacia delante y hacia atrás.Al llegar a la comisura postrior se produce una extensión submucosa al lado contralateral,a las regiones supraglótica y subglótica y ocasionalmente a las estructuras extralaringeas.Desde el punto de origen también puede extenderse a la supraglotis y subglotis.Los tumores glóticos pueden además progresar en profundidad a través del ligamento vocal y el cono elástico al músculo tiroaritenoideo y hacia el espacio paraglótico de lo cual resulta la fijación de la cuerda,extensión subglótica,invasión del cartílago y propagación extralaringea.La invasión tumoral de la apófisis vocal del aritenoides y la extensión subglótica también pueden producir la fijación de la cuerda.

Cuando el tumor se extiende fuera de la laringe el lugar más común es la linea media anterior,bien a través del cartílago tiroides o bien a través de la membrana cricotiroidea.

1-5-5-3.-Carcinoma subglótico.

El carcinoma subglótico primario constituye una rareza siendo más frecuente la extensión subgótica de un tumor glótico.

Hemos de tener en cuenta que la clasificación topográfica de los tumores es un instrumento clínico empleado más para describir el estado actual de una neoplasia que para precisar su lugar de origen.El comportamiento y el pronóstico dependen,como es lógico,más de la extensión laringea o extralaringea de las lesiones que del lugar exacto del que se originó.Es por esto por lo que se considera que las lesiones de cuerda vocal que se extienden menos de un centímetro bajo la glotis,es decir,las situadas por encima de la membrana cricotiroidea son tumores glóticos desde el punto de vista clínico.Por

el contrario los situados a un centimetro o más bajo las cuerdas se comportan de una manera parecida,tanto si se han originado en la región subglótica como si resultan de la extensión hacia abajo de una lesión glótica,con respecto a la capacidad de invasión,extensión extralaringea,diagnóstico e indicación terapeutica.

Los tumores subglóticos tienden a alcanzar el músculo tiroaritenoideo a través del cono elástico sin llegar a la mucosa del borde libre de la cuerda vocal,invaden los cartílagos laríngeos y se extienden facilmente por fuera de la laringe a través de la membrana cricotiroidea o cricotraqueal.

El carcinoma subglótico frecuentemente se asocia a invasión hipofaringea y esofágica alta,afectación de la glándula tiroides y metástasis de los ganglios linfáticos paratraqueales.

1-5-5-4.-Carcinoma transglótico.

El término transglótico se usó en principio para describir los tumores que cruzan el ventrículo afectando las regiones supraglótica y subglótica.Posteriormente y por extensión se aplica este término a aquellos tumores que llegan al espacio paraglótico,sea su origen ventricular o no y se extienden hacia arriba o hacia abajo.

Ya en 1948 BACLESSE y LEROUX-ROBERT describieron el carcinoma transglótico con cierto detalle sin llamarlo por este nombre.Ambos autores le atribuyeron un origen ventricular.La expresión transglótico fue empleada por primera vez por MCGAVRAN en 1955.

Los tumores transglóticos poseen

márgenes infiltrativos en más de la mitad de los casos descritos,lo cual explica en parte su gran poder metastatizante,invaden con frecuencia el esqueleto laringeo y se exteriorizan facilmente a través del espacio cricotiroideo y cricotraqueal.El diagnóstico mediante biopsia es di cil por la poca afectación de la mucosa superficial a pesar de existir una gran invasión.

La invasión tumoral del esqueleto laringeo comienza generalmente en los puntos de osificació presentes a partir de la tercera década de la vida.Estos se localizan fundamentalmente en el asta tiroidea inferior desde donde asciende siguiendo el borde posterior del ala tiroidea en ambos lados;en la porción inferior de la quilla tiroidea y en el borde superior del cartílago cricoides.

El porqué de la preferencia de las células tumorales por el tejido oseo de los cartílagos es algo que se desconoce por completo.ORR (1979) sugiere la posibilidad de un factor quimiotáctico.

Desde el punto de osificación el tumor puede extenderse al cartílago circundante conservando intacto el pericondrio subyacente.

La invasión del esqueleto laringeo es variable y está relacionada con la localización inicial del tumor primario.Los transglóticos son los tumores que con más frecuencia infiltran el cartílago en un 50% de los casos,seguido por los glóticos,en cambio es un fenómeno raro en los supraglóticos

1-5-6.-Tipos histológicos de cancer laringeo.

Segun la extirpe celular de la que procedan,los cánceres laringeos pueden clasificarse en cuatro grandes grupos (FERLITO 1976,BATSAKIS 1985):

1-de extirpe epitelial
2-carcinosarcomas
3-no epiteliales
4-metastásicos

Cada uno de estos grupos puede dividirse en subgrupos,que a su vez incluyen varios tipos celulares.

1-5-6-1.-De extirpe celular.

Nuestro interés se centra fundamentalmente en los tumores procedentes del epitelio de superficie, poliestratificado plano o pseudoestratificado,por lo que describiremos sus variedades histológicas en detalle especialmente en el caso del tumor de células escamosas;los restantes tipos histológicos pueden considerarse en la mayor parte de los casos excepcionales por lo que no creemos oportuna su exposición en el presente trabajo,procediéndose exclusivamente a la enumeración de los que con mayor frecuencia aparecen en la literatura.

1-5-6-1-1.-Carcinoma de células escamosas.

Es el tumor laringeo más frecuente.Se origina bien directamente del epitelio plano poliestratificado o indirectamente a partir del pseudoestratificado de tipo respiratorio tras metaplasia escamosa.

Puede clasificarse en bien diferenciado,moderadamente diferenciado,pobremente diferenciado e indiferenciado (ALBERTINI 1955;FERLITO

1976).Los bien diferenciados se caracterizan por presentar células de forma poliédrica,estratificación evidente,puentes intercelulares y perlas epiteliales o globos corneos.Los nucleos son hipercromáticos y se encuentra alterada la relación nucleo-citoplasma.El estroma conectivo está infiltrado por nidos irregulares de células epiteliales malignas,pero son raras las figuras de mitosis.

En los moderadamente diferenciados ... hay globos corneos,los nucleos son pleomorfos y las mitosis numerosas y atípicas.Se conserva en cambio la estratificación y la forma poligonal de las células.

En los pobremente diferenciados las células no muestran diferenciación alguna,dejando ver un gran pleomorfismo nuclear,hipercromatismo y escasos puentes intercelulares.

El carcinoma indiferenciado es un tumor poco frecuente pero no excesivamente raro.Está formado por células anaplásicas del epitelio de superficie con una gran tendencia a invadir el estroma subyacente.Las céluas se organizan en nidos o racimos con gran cantidad de atipias y mitosis anómalas.Son frecuentes en una visión de comjunto las areas de necrosis.Se le llama también tumor de células transicionales o carcinoma basalioide,terminolcgia que en opinión de FERLITO (1976) debe abandonarse.

Histoquímicamente en el carcinoma epidermoide laringeo el material PAS positivo es más intenso en el estroma que en la zona epitelial y con la reacción de PAS-diastasa puede observarse un reticulo persistente de mediana intensidad.

En microfotometria se utiliza un dispositivo (fotosensor)que recoge las ondas luminosas y las traduce en medidas eléctricas.A dicho fotosensor (fotocátodo)llega un flujo radiante que se transforma en corriente eléctrica,la cual mediante pasos sucesivos multiplica su potencial para mover un indicador de voltaje.Es decir,el fotocátodo es impresionado por una"unidad de flujo radiante".La sensibilidad del fotocátodo viene expresada por la corriente eléctrica que puede medirse a su salida.Esta medida se amplia por un sistema de diodos (PILLER 1977)(Esquema2).

La luz que se usa en los microscopios comerciales tiene una longitud de onda que oscila entre 250 y 1.100nm.La radiación ultravioleta se encuentra comprendida entre 250 y 400 nm;la luz visible entre 400 y 700 nm; y la infraroja entre 700 y 1.100 nm.Lo que se mide en fotometria microscópica es la longitud de onda de una radiación que depende de la luz emitida por la fuente luminosa,del sistema óptico y mecánico del microscopio y naturalmente del objeto de estudio.

El filtro de color aisla una banda de ciertas longitudes en cualquier grupo de los citados anteriormente dejando pasar sólo esa amplitud.Una banda ancha basta para estudiar propiedades ópticas que varien dentro del correspondiente territorio lumínico vibrante:estudios densitométricos o fotométricos.

Para saber la corriente que emanará de un fotocátodo es preciso conocer los factores que modifican la marcha de los rayos dentro del microscopio.Todos ellos forman parte del flujo radiante que se expresa en watios de energia eléctrica (W).Estos factors son:

Hay reacción positiva al azul alcián pH=2'5,débil en la zona epitelial y en mayor o menor grado en el estroma con disposición reticular.

Con la reacción del PAS sin contratinción se pone de manifiesto de forma especial la membrana basal.

Con azul de toluidina se comprueba la ortocromasia de la porción epitelial y la metacromasia del cartílago y glándulas.Pueden evidenciarse abundantes células cebadas en el estroma,con nucleo ortocromático y citoplasma metacromático.

En conclusión, puede destacarse:

-la escasa presencia de mucopolisacáridos diastasa extraibles

-presencia de glicoproteinas (mucopolisacáridos neutros)

-presencia de mucopolisacáridos ácidos carboxílicos y/o sulfatados

-y actividad de fosfatasa alcalina a pH=9'4 en diferentes partes del epitelio proliferante como signo de transfosforilación.

Ultraestructuralmente en el carcinoma epidermoide pueden distinguirse tres tipos de células tumorales:

-tipo I.Contienen gran cantidad de poliribosomas con escaso desarrollo de reticulo endoplasmático estando este vacuolado con un contenido homogeneo amorfo.Las mitocondrias son pequeñas y escasas.El aparato de Golgi está poco desarrollado.Un dato importante es la ausencia casi absoluta de tonofilamentos aunque ocasionalmente se

pueden encontrar pequeños acúmulos de ellos.

Es frecuente la observación de prolongaciones citoplasmáticas que se dirigen hacia el polo superficial.En estas zonas el reticulo citoplasmático presenta una extraordinaria dilatación con ribosomas adheridos a su membrana.El nucleo es generalmente oval o redondeado y rara vez invaginado.La cromatina es fina con gránulos más densos adheridos a la membrana nuclear.El nucleolo es siempre manifiesto.

Estas células que por su aspecto corresponden a los elementos germinativos de un epitelio plano estratificado están en contacto con el tejido conjuntivo del estroma siendo raras las uniones intercelulares que a veces forman prolongaciones que recuerdan a los microvilli.Las uniones de caracter desmosómico son muy escasas.

-tipo II.Tendria como equivalente en microscopia óptica a las células de diferenciación moderada.Se caracterizan por presentar densos acúmulos de tonofilamentos que frecuentemente atraviesan todo el citoplasma.En las areas de citoplasma en las que no hay tonofilamentods pueden hallarse mitocondrias que presentan fenómenos de tumefacción.El reticulo endoplasmático está póbremente desarrollado y apenas se ven lisosomas,lo cual puede tomarse como dato diferencial con respecto a las células de tipo I.

El nucleo oval o redondeado presenta gran número de invaginaciones que le dan un un aspecto irregular.La cromatina está más densamente distribuida que en las células tipo I no

existiendo condensaciones bajo la membrana nuclear.Es frecuente
el hallazgo de dos o tres nucleolos.Las uniones intercelulares
son muy densas mostrando gran cantidad de desmosomas.

-tipo III.Son células de citoplasma denso con gran cantidad de tonofilamentos.Se encuentran ribosomas libres y formando agrupaciones de caracter póliribosómico.Son frecuentes las dilataciones saculares del reticulo endoplasmático y hay mayor cantidad de lisosomas que en las células de tipo II.En algunas zonas estas dilataciones de reticulo endoplasmático contienen un material granuloso fino,precipitado dentro del sáculo.El nucleo es regular,fusiforme,con gránulos de cromatina adheridos a la membrana nuclear y nucleolo muy manifiesto.

De lo expuesto anteriormente podria concluirse que las células de tipo I tienen un nivel de organización más primitivo,de dificil filiación.Las células tipo II y III son elementos más diferenciados siendo el dato dominante el gran acúmulo de tonofilamentos,lo que puede sugerir una gran tendencia a la queratinización.

Las células tipo III se caracterizan por presentar en su citoplasma un sistema vacuolar bien desarrollado con ribosomas unidos a su membrana lo que habla a favor de su capacidad de síntesis proteica.

El reticulo endoplasmático de los tipos celulares II y III tiene una distribución muy parecida a la de las células de los estratos inferior y medio de un epitelio plano poliestratificado normal,lo cual hace pensar en su posible origen a

partir de ellas (LOPEZ-CAMPOS 1975).

Recientemente OLOFFSON (1983) ha aplicado la microscopia electrónica de barrido en el estudio comparativo de muestras de mucosa laringea normal y con carcinoma epidermoide llegando a la conclusión de que con este método se pueden establecer claras diferencias entre la mucosa normal y tumoral sugiriendo su aplicación en los casos de diagnóstico dudoso con el microscopio de luz ordinario.Las irregularidades de la superficie celular parecen guardar además cierta correspondencia con el grado de malignidad tumoral.El microscopio electrónico de barrido (MEB) es capaz de reconocer diferencias entre el epitelio normal premaligno y maligno.

En el caso concreo de las muestras de mucosa laringea no maligna,incluidas las de mucosa normal y lesiones benignas,la superficie poligonal de las células presenta pequeñas elevaciones lineales en forma de microcrestas y microsurcos de dirección caprichosa,mal definida y de distribución variable de célula a célula .El epitelio escamoso en la vecindad del carcinoma conserva organización,en cambio en las areas tumorales la superficie celular es más lisa,el número de microelevaciones decrece hasta hacerse practicamente inexistente y la reducción del número de proyecciones da lugar al aspecto de "campo desnudo" de las células cancerosas (SURJAN 1985).

Tradicionalmente se considera al carcinoma epidermoide de laringe como un tumor con capacidad metastásica en los linfáticos cervicales pero con poca tendencia a producir metástasis a distancia.Este concepto se ha generalizado entre los clínicos por lo que la búsqueda de la diseminación metastásica no suele formar parte del proceder habitual en el estudio completo del paciente con

carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.

El reciente trabajo de ZBAREN (1987) intenta poner de manifiesto el grave error de esta idea preconcebida.Según este autor en el 40% de las necropsias efectuadas sobre un total de 101 pacientes clínicamente Mo se hallaron metástasis;pulmonar en el 70% de los casos,hepática en un 42% y osea en un 15% existiendo una estrecha correlación entre el número de ganglios linfáticos afectados y la presencia de metástasis sistémicas.

1-5-6-1-2.- Carcinoma verrugoso.

Se trata de una neoplasia de bajo grado de malignidad y sin capacidad metastatizante.Histológicamente está formada por cordones papilomatosos de células escamosas bien diferenciadas.Las mitosis son raras y faltan por completo los criterios clásicos de malignidad.El estroma muestra numerosas células inflamatorias principalmente linfocitos y células plasmáticas que parecen delimitar la masa tumoral.Pueden observarse globos corneos y pequeños quistes epiteliales así como granulomas de cuerpo extraño en las zonas donde abunda la queratina.

Son tumores de escaso poder infiltrante siendo su crecimiento principalmente expansivo.

1-5-6-1-3.- Linfoepitelioma.

Puede considerarse una variante del carcinoma epidermoide laringeo.Está constituido por células de extirpe epitelial pobremente diferenciadas intimamente mezcladas con linfocitos,los cuales no forman parte del componente

tumoral.

Fue descrito por primera vez por REGAUD y SCHMINKE de forma independiente en 1921 (BATSAKIS 1985).Clásicamente se distinguen dos patrones histológicos de linfoepitelioma:el de REGAUD en el que las células tumorales forman nidos de diversos tamaños rodeados por tejido linfoide y el de SCHMINKE en el que se disponen de forma aislada,sin agruparse,inmersas en un estroma con abundantes linfocitos.

Las células epiteliales son de gran tamaño y de forma redondeada o poligonal con citoplasma claro,tienen una apariencia sincitial.El nucleo es de forma oval con su cromatina dispuesta en la periferia y de gran tamaño.El estroma tisular es generalmente escaso.

Los estudios con microscopia electrónica han demostrado la existencia de tonofilamentos,desmosomas y fibras de queratina indicando un claro origen epitelial (MORI y LENNERT 1969).Es por esto por lo que el témino más ampliamente usado de linfoepitelioma deberia cambiarse por el de carcinoma linfoepitelial que indicaria más claramente su origen (FERLITO 1974).

1-5-6-1-4.-Pseudosarcoma

Se considera una variedad poco común de carcinoma epidermoide.Se encuentra más frecuentemente en la cuerda vocal verdadera.Está caracterizado por la presencia de células alargadas en forma de uso muy parecidas a las del fibrosarcoma con abundante pleomorfismo nuclear y mitosis atípicas.En ocasiones pueden observarse células multinucleadas.

Un examen histológico minucioso pone de manifiesto en la mayoria de los casos areas de carcinoma epidermoide más o menos diferenciado.

La malignidad de las células pseudosarcomatosas no se ha comprobadode forma absoluta.

La ausenciade un componente epitelial típico como ocurre en los fragmentos de biopsia pequeños puede llevar al diagnóstico erroneo de sarcoma.

La diferencia con el sarcoma verdadero puede ser dificil basándose exclusivamente en el aspecto histológico de las preparaciones observadas con microscopio óptico.Es precisamente en estos casos donde los métodos inmunohistoquímicos tienen toda su aplicación.

Recientemente se ha comprobado la captación por parte de las células epiteliales de anticuerpos antiqueratina a diferencia de otras estirpes celulares(SHI 1984).El grado de captación seria además proporcional a la diferenciación tumoral.

De igual manera que en las células epiteliales normales y tumorales puede detectarse la presencia de queratina,en el tejido mesenquimal normal y tumoral puede hallarse una proteina análoga:la vimentina.Con la utilización de anticuerpos monoclonales antiqueratina y antivimentina MEIJER (1988) ha podido delimitar cuatro areas inmunihistoquímicas en el pseudosarcoma :un area claramente epitelial queratin positiva pura,una area de transición predominantemente

vimentin positiva,una area pseudosarcomatosa también predominantemente vimentin positiva y por último un area mixoide queratin y vimentin positiva.La co expresión de las regiones mixoides es interpretada como un fenómeno de involución por el que un tipo celular indiferenciado sintetizaria una forma embrionaria de filamento proteico.

Para GOELLNER (1973) el pseudosarcoma es una proliferación reactiva de histiocitos y fibroblastos como respuesta del estroma al carcinoma epidermoide.BATTIFORA (1976) explica el pseudosarcoma como una degeneración maligna de una metaplasia mesenquimal originada a partir de un epitelio poliestratificado plano anormal.Las fibras colágenas estarian sintetizadas por estas células metaplásicas.Actualmente se considera al pseudosarcoma como un tumor de pobre pronóstico y alta capacidad metastatizante.

1-5-6-1-2 Tumores procedentes del epitelio glandular y/o ductal.

En este grupo pueden incluirse el adenocarcinoma,carcinoma de células gigantes,carcinoma de células claras,carcinoma adenoescamosos o carcinoma epidermoide dentro de un adenocarcinoma (FERLITO 1976),carcinoma maligno mixto,también llamado carcinoma en un adenoma pleomorfo (MCMILLAN 1986),carcinoma mucoepidermoide (BATSAKIS 1985),cilindroma o carcinoma adenoide quístico (STILLWAGON 1985) y el carcinoma de células escamosas (FRIEDMAN 1976).

1-5-6-1-3 Tumores procedentes de las células argiróFilas de la mucosa laringea.

Son principalmente el tumor carcinoide

(PATTERSON 1987) y el carcinoma de células en avena (TONCINI 1984).

1-5-6-2.- Carcinosarcoma.

Neoplasia extraordinariamente rara en la laringe.Consiste en una mezcla de elementos carcinomatosos y sarcomatosos.

Debe distinguirse del pseudosarcoma y del llamado "tumor de colisión" en donde también hay elementos de una y otra extirpe sin relación alguna.Se considera que en el carcinosarcoma verdadero las dos estirpes de células malignas,epitelial y del estroma,provendrian de un único elemento celular indiferenciado (FERLITO 1976).

1-5-6-3.- Tumores laringeos no epiteliales.

Constituyen la mayoria de ellos una rareza.Pueden citarse el quiste oseo aneurismático (LEVINE 1986),el angiomiolipoma (TUBS 1986),el hemangioma cavernoso (FERGUSON 1977),el condroma (ADLER 1986),el condrosarcoma (HOLSBEEK 1985;FINN 1984;BROWN 1985),el histiocitoma fibroso atipico (VOLMER 1985),el ganglioneuroma maligno (LEVINE 1986),tumor de células de la granulosa (HABEL 1984;PESCE 1985),quemodectoma (HANNA 1986),hamartoma (SAMUEL 1985),blastoma (EBLE 1985),sarcoma de Kaposi (COYAS 1983),liposarcoma(MANSON 1987;ALLSBROOCK 1985),el linfangioma (HOWARD 1986),el melanoma maligno primario (TONCINI 1983;REUTER 1986),el neurofibroma (OGURA 1974),el linfoma no hodgkin (SWARDLOW 1984),sarcoma osteogénico (TUBS 1986),oncocitoma (PUTMAN 1979) y plasmocitoma (GORNLEY).

1-5-6-4.- Tumores metastásicos

El melanoma laringeo de origen cutaneo es el que metastatiza la laringe con más frecuencia.Representa la tercera parte de todas las metástasis de este órgano.Le sigue en frecuencia el carcinoma renal.

Otros tumores primarios a considerar son los de mama,pulmón,próstata y colon (BATSAKIS 1985).

1-6.-PUESTA AL DIA DE LOS HALLAZGOS ANATOMOPATOLOGICOS DE INTERES PRONOSTICO EN EL CANCER LARINGEO.

1-6-1.-Caracteristicas anatomopatológicas del tumor primario.

La gradación histológica del cancer puede definirse como u. intento de medir la agresividad de un tumor.

Hasta ahora las técnicas clásicas de gradación se basan fundamentalmente en datos referentes a la anatomia patológica del tumor primario e incluyen entre otros la evaluación del tipo histológico,la diferenciación del mismo,la atipia citológica y actividad mitótica y la presencia o no de extensión local y metástasis regionales o a distancia.Todos estos parámetros clásicos son contrastados por los diferentes autores y en diferentes tipos de tumor con el fin de usar los más adecuados en cada caso según el objetivo que se pretenda alcanzar.

En el caso concreto de los tumores de localización laringea son de gran interés el tamaño y localización del tumor primario,el número,tamaño y localización de las adenopatias cervicales y la existencia o no de metástasis a distancia.A través de ellos se consigue la gradación clinica y/o patológica en estadios del I al IV (BLACK 1985;SISSON 1985).

Un dato de gran importancia además de la clasificación en estadios es el conocimiento del grado de diferenciación.Se entiende por diferenciación la medida en que la células tumorales guardan semejanza con las células normales de origen,mostrando sus caracteres morfológicos plenamente maduros.Cuanto mayor sea la semejanza con

sus antecesores normales tanto mayor será la diferenciación y por el mismo motivo tanto menos agresivo.Es fácil comprender que un carcinoma de laringe de escasa diferenciación y estadio IV es de peor pronóstico que un estadio I bien diferenciado.

El estadio y grado de diferenciación son por tanto parámetros de gran valor pronóstico,,sin embargo,no son los únicos a tener en cuenta e incluso en ciertas ocasiones pueden inducir a error,por ejemplo:

-conforme ha mejorado el conocimiento de la anatomia funcional de la laringe se ha comprobado que no siempre se valoran suficientemente ciertos matices que pueden influir y mucho a la hora de evaluar el estadio tumoral;así aunque el espacio preepiglótico y el ventriculo son supragloticos no se comportan lo mismo los tumores de esta localización que alcanzan facilmente el espacio paraglótico que los situados en la banda ventricular (TUCKER 1973).

-cuando tras palpar un cuello lo calificamcs de No,en un 40% de los casos el estudio anatomopatológico pondrá de manifiesto adenopatias metastásicas.

-un patólogo que examine cortes seriados de un ganglio linfático podria descubrir una célula anormal entre diez o cien normales,pero no entre mil células normales.Un gramo de tejido del organismo contiene 1000000000 células y si hubiera una célula anormal entre mil habria 1000000 células tumorales;sin embargo un patólogo aún no llamaria positivo a un ganglio de un gramo con un millón de células tumorales (SNYDERMAN 1985;ARIYAN 1977).

Estos ejemplos ilustran claramente la necesidad de encontrar otras medidas y otras variables que por si mismas o junto con las ya establecidas pueden ser relacionadas más exactamente con la agresividad tumoral.

En el presente capítulo pretendemos hacernos eco de las lineas básicas de investigación que tienen como objetivo fundamental la valoración de hallazgos puramente anatomopatológicos y su posible aplicación práctica como factores pronósticos.

En 1971 BENNET estudia el valor pronóstico del grado histológico del tumor primario,la infiltración linfoide,la presencia de adenopatias metastásicas y el patròn histológico de los ganglios linfáticos que este autor divide en cuatro grupos:

-histiocitosis sinusal cuando hay un aumento de las células histiocitarias en los senos.

-hiperplasia folicular o de centros germinales cuando todo el tejido ganglionar está formado por ellos

-plasmocitosis si por el aspecto histológico calcula más del 50% de células plasmáticas en los cordones medulares y

-presencia de células pironinófilas.

Divide el grado histológico del tumor primario en cuatro grupos de mayor a menor diferenciación aplicando la clasificación propuesta

por ALBERTINI en 1955.

Los parámetros que mejor se correlacionaron con la supervivenvia del paciente a los cinco años son la presencia de adenopatias metastásicas y el grado histológico del tumor primario.La infiltración linfoide se consideró un signo favorable sólo en el grupo de pacientes con adeno patias metastásicas o en tumores bien y moderadamente diferenciados.En estos casos la supervivencia fue mayor en los pacientes con gran cantidad de linfocitos peritumorales.En cuanto al patrón histológico ganglionar únicamente la hiperplasia folicular con centros germinales reactivos pudo relacionarse con la mayor supervivencia en aquellos pacientes con adenopatias metastásicas o bajo grado de diferenciación del primario.

El estudio de **BENNETT** puede considerarse clásico por su amplitud y minuciosidad,por lo que la mayor parte de las publicaciones posteriores relacionadas con el tema suelen tomarlo como referencia.

En 1973 JAKOBSSON propone un sistema de valoración del tumor primario y de la relación huesped tumor basándose:

-para lo priemero en la diferenciación tumoral, tomando como dato fundamental para la misma la formación de queratina,la presencia de atipias nucleares,la clasificación de BRODERS (1927) para el grado de diferenciación y la cantidad de mitosis

- y para lo segundo en el patrón de invasión (exofitico o infiltrante),

la presencia de microinvasión vascular,la respuesta linfocitaria del huesped y la profundidad de la invasión del tumor primario en el estroma subyacente.

Este autor asigna un número del 1 al 4 a cada uno de estos parámetros dando un valor pronóstico a la puntuación global obtenida.

Para FERLITO (1976) es mucho más importante el grado de diferenciación histológica del tumor primario que la respuesta linfocitaria del huesped en la inmediación de la neoplasia.Este autor comprueba la poca relación existente entre ambos factores ya que a diferencia de lo que cabria esperar,la mayor parte d los tumores bien diferenciados muestran una escasa cantidad de linfocitos peritumorales.Al igual que BENNETT (1971) concluye que el grado de infiltración linfoide sólo tiene valor pronóstico en pacientes con carcinoma epidermoide bien y moderadamente diferenciado.

En 1982 HOLM aplica una modificación del sistema de valoración de JACKOBSSON (1973) suprimiendo la gradación histológica del primario según BRODERS (1927) y la presencia de microinvasión vascular como datos a tener en cuenta.Según este autor la supervivencia a los cinco años es del 88% para los pacientes con puntuación global inferior a 13 y del 44% para aquellos en que ésta es superior a 16.

BATSAKIS centra su atención en la presencia de células tumorales aisladas o de nidos celulares en el interior de vénulas y linfáticos (1984) y en la invasión por parte del tejido tumoral de los nervios situados en su proximidad (1985).

En el primer caso concluye que tomado de forma aislada e independientemente del tamaño,localización y grado histológico del tumor primario la microinvasión vascular de células tumorales tiene escasa importancia pronóstica ya que tan solo se relaciona con la presencia de metástasis en los ganglios regionales y no con el desarrollo de metástasis a distancia como cabria esperar.

En el segundo caso confirma la facilitación de la extensión tumoral,bien a través del espacio existente entre endo,epi y perineurio,bien invadiendo los linfáticos del epineurio y perineuro.

CLOSE (L987) afirma en su estudio que el único dato anatomopatológico relacionado significativamente con la presencia de metástasis en los linfáticos regionales es la presencia de microinvasión vascular,no existiendo relación alguna estadisticamente demostrable entre otros parámetros tales como tamaño del tumor primario,grado de diferenciación,invasión del estroma, modo de crecimiento,infiltrado linfoide peritumoral e invasión perineural y metástasis cervical.

1-6-2.-Cancer laringeo y respuesta inmunitaria.

1-6-2-1.-Respuesta inmunitaria local.

El concepto de vigilancia inmunológica lo estableció por primera vez PAUL EHRLIG EN 1908 cuando postuló la posibilidad de que durante el desarrollo fetal y post fetal se produjeran clones de células aberrantes que en su mayoria quedarian en un estado latente debido a los mecanismos de protección del organismo.

En 1957 MACFARLANE BURNET postuló la teoria de la inmunovigilancia según la cual los pequeños acúmulos de células cancerígenas que se desrrollasen en el organismo serian eliminados mediante una reacción inmunológica producida frente a los nuevos determinantes antigénicos que expresan las células tumorales.Esta teoria en 1970 atribuyó la resistencia del organismo frente a los tumores a la destrucción de las células susceptibles de transformación neoplásica por linfocitos maduros inmunes del tipo T .Implicaba pues la existencia de un único mecanismo de defensa inmunológica dependiente de las células T.Sin embargo actualmente se tiene evidencia de múltiples formas de defensa antitumor que actuan interaccionadamente y que implican además de las células T,a las células NK (naturales citotóxicas), a los macrófagos del sitema reticuloendotelial,a las céluas K mediadoras de citotoxicidad dependiente del anticuerpo,a anticuerpos citotóxicos que fijan el complemento,a linfoquinas y citoquinas que actuan como mediadores solubles de la reactividad inmunológica y a otros sistemas de vigilancia intracelular,como el mecanismo de reparación del DNA,que eliminaria potencialmente mutaciones cancerígenas en las células susceptibles de transformación maligna.

El sistema inmune por si mismo y a través de sus interrelaciones con otros sistemas constituye probablemente el mecanismo de mayor eficacia en el control de la neoplasia.Como consecuencia hay un gran interés en encontrar parámetros que reflejen la respuesta frente a la célula tumoral y a los cuales puede atribuirse un cierto valor en la práctica.

Desde 1975 y gracias a los trabajos de KOELER y MILSTEIN se dispone de anticuerpos monoclonales cuyo uso en la práctica supuso un considerable avance en los conocimientos existentes

hasta entonces en el campo de la inmunologia e inmunopatologia.

Una de las innumerables aplicaciones de los anticuerpos monoclonales es la tipificación de las distintas subpoblaciones de células implicadas en los mecanismos de defensa antitumor.

Dado el creciente interés existente en atribuir importancia pronóstica al infiltrado linfocitario peritumoral en el caso de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello no es de extrañar la aparición de un número cada vez mayor de trabajos relacionados con este tema a partir de los primeros años de la presente década.

En 1985 HARABUCHI describe las distintas subpoblaciones linfocitarias existentes en el infiltrado peritumoral de carcinomas epidermoides de lringe usando anticuerpos monoclonales puestos de manifiesto mediante la técnica de peroxidasa antiperoxidasa (PAP).Según este autor la mayor parte de las células situadas tanto en la periferia como dentro de la masa tumoral son linfocitos T;de ellos los T-supresores (puestos de manifiesto por el anticuerpo monoclonal Leu 2a) se situan tanto en la periferia como en el interior de los nidos tumorales en igual proporción.Los T-"helper" (monoclonal Leu 3a) se localizan fundamentalmente en la periferia del tumor aunque pueden hallarse en el interior de forma aislada.Las células plasmáticas (B1) se encuentran exclusivamente en la periferia tumoral y en escasa proporción,al igual que las células NK ("natural killer",identificadas por el monoclonal Leu 7).

ZEROMSKI (1986) comprueba en primer lugar la escasa relación existente entre el grado de diferenciación del tumor primario (bien,moderadamente

y pobremente diferenciado) y la cantidad de infiltrado linfocitario peritumoral (escaso,moderado y abundante).Según este autor el número de células inmunocompetentes en el interior de la masa tumoral es menor cuanto mayor es el infiltrado peritumoral y aumenta a medida que decrece el número de linfocitos peritumorales.Este aumento en el interior de los nidos tumorales se produce a expensas de los linfocitos T-"helper" , monocitos y un aumento de los T-supresores.De esta forma puede concluirse que cuando el infiltrado peritumoral es escaso los linfocitos T-supresores son abundantes tanto en la periferia como en el interior de la masa tumoral.

Las células plasmáticas se disponen siempre en la periferia del tumor y se encuentran en escasa proporción aun cuando el infiltrado peritumoral es abundante.

Por último ZEROMSKI intenta establecer una relación entre el tipo de linfocito predominante en el infiltrado peritumoral y la presencia de adenopatias metastásicas.Según él una gran proporción de células T-"helper" en las inmediaciones del tumor es más frecuente en los pacientes No;en los N3 en cambio son más comunes los infiltrados con escasa cantidad de T-supresores.Ninguno de estos resultados pudo comprobarse estadisticamente.

HOLGATE (1986) en su estudio intenta simplificar la técnica de la determinación de las subpoblaciones linfocitarias usando material fijado en formol e incluido en parafina comparando sus resultados a los obtenidos con el método habitual de cortes de tejido no fijado ultracongelado en nitrógeno líquido.

DANIELSON (1987) usando técnicas de

inmunofluorescencia sobre material incluido en parafina estudia los distintos tipos de inmunoglobulinas sintetizadas por las células plasmáticas en las inmediaciones del tumor primario y metastásico.

La IgG se encontró en el 80-90% de las células plasmáticas peritumorales tanto del tumor primario como del metastásico,seguida de la IgA;la IgM y la IgE fueron encontradas rara vez y de forma aislada.En ningún caso pudo detectarse la presencia de IgD.

1-6-2-2.-Respuesta inmunitaria regional.

En la práctica clinica se da gran importancia a la presencia de metástasis gangliopnares como signo desfavorable en el estudio global del paciente neoplásico.En el caso concreto de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello las adenopatias cervicales pueden ser su primera manifestación lo que unido a las dificultades que entraña su extirpación quirúrgica,generalmente más laboriosa que la del tumor primario,puede explicar el hecho de que algunos lo hayan considerado como entidad nosológica independiente refirendose a ella como "enfermedad metastásica ganglionar".

El estudio anatomopatológico de las adenopatias cervivales metastásicas o no sigue siendo objeto de múltiples investigaciones que básicamente y como en el caso del tumor primario,pretenden obtener datos o patrones páramente histológicos relacionables en mayor o menor medida con la evolución posterior del paciente.

GRANDI (1985) estudia el valor

pronóstico de las adenopatias cervicales independientemente de las características anatomopatológicas generales del tumor primario.Básicamente su trabajo consiste en relacionar el tamaño y fijación de los linfáticos,su localización cervical, la existencia o no de metástasis y la extensión extracapsular del tumor con la supervivencia en un periodo de cinco años.Sus resultados pueden resumirse en los siguientes puntos:

-conforme aumenta el tamaño y la fijación de las adenopatias la supervivencia a los cinco años es menor, aunque este resultado no pudo comprobarse estadisticamente.

-la supervivencia decrece significativamente en relación con la localización más baja de los linfáticos cervicales,siendo esta inferior a los dos años en todos los casos si el ganglio o ganglios metastásicos se localizan en la región supraclavicular o en la porción inferior de la cadena yugular interna.

-la presencia de metástasis ganglionares empeora el pronóstico y más si la metástasis es bilateral.En cambio no hubo diferencias estadisticamente significativas en cuanto a la supervivencia de pacientes en cuyas adenopatias se encontró extensión extracapsular y los que no la presentan.

-la probabilidad de recidiva local es mayor en los pacientes con adenopatias metastásicas con respecto a los No.En cambio no influyó estadisticamente hablando en el hecho de presentar o no extensión extracapsular.

-el pronóstico es peor en los pacientes con más de tres adenopatias metastásicas

Para SNYDERMAN (1985) cuando en la clínica calificamos un cuello de No en el 40% de los casos habrá adenopatias histológicamente positivas (N+) que en un 20% además presentan extensión extracapsular (EEC).

Comprueba la poca relación existente entre el tamaño del tumor primario y la presencia de EEC y a diferencia de GRANDI (1985) pone de manifiesto el peor pronóstico a los tres años de los pacientes N+ con EEC,comparados con el grupo formado por los No y N+ sin EEC.

JOHNSON en su publicación de 1985 demuestra la menor supervivencia a los dos años en los pacientes con EEC y la aparición más temprana en éstos de recidiva local.

CARTER (1985) observa EEC en la mayor parte de las adenopatias de más de tres centímetros de diámetro (69%).Según este autor la incidencia de recidivba local es mayor en los casos con EEC macroscópica (44%) y menor en los que la EEC es microscópica (25%) incluso pudo evidenciarse en un 32% de casos N+ sin EEC y en un 13% de casos histológicamente negativos.Cuando se produce la recidiva ésta afecta principalmente al músculo y a la adventicia de la yugular interna apareciendo en todos los casos dentro de los 12 meses siguientes a la intervención.

RICHARD (1987) introduce en su trabajo dos nuevos parámetros a tener en cuenta:la presencia o no de émbolos de células tumorales en los vasos

linfáticos (E+/-) y el tamaño de la mayor adenopatia metastásica.

Sus resultados podrian enumerarse de la siguiente forma:

-el pronóstico es significativamente peor en los pacientes N+ con EEC que en los N+ sin EEC y en estos que en los histológicamente negativos (N-)

-la presencia de E+ tanto en los N+ sin EEC como en los N+ con EEC es un factor desfavorable, lo cual puede comprobarse estadisticamente.

-el número total de adenopatias metastásicas no tiene relación alguna con la supervivencia.

-la recidiva local no fue significativamente más alta en los N+ con EEC que en los N+ sin EEC y en estos que en los N-,aunque si se observó una mayor tendencia a la recidiva en los pacientes N+ con EEC.El factor E en cambio no tiene relación con la aparición de recidiva local.

-por último,la supervivencia a los cinco años de los pacientes cuya mayor andenopatia metastásica es de más de dos centímetros de diámetro fue menor que en aquellos en los que no superaba los dos centímetros.El autor da una extraordinaria importancia pronóstica a este hecho,proponiendo su incorporación al sistema TNM (UICC 1969-1973).

Para MORRA (1987) la presencia de adenopatias metastásicas empeora extraordinariamente el pronóstico y más aún si éstas muestran extensión

extracapsular.

1-6-2-2-1.-Patrón histológico ganglionar.

BLACK (1956) es el primero en darse cuenta de la relación existente entre el patron histológico ganglionar y la supervivencia del paciente en el cancer de mama.Usando las adenopatias ipsilaterales obtenidas en la mastectomia radical observó que las pacientes en cuyos nódulos axilares se mostraba histiocitosis sinusal tenian una supervivencia mayor.La histiocitosis sinusal debe considerarse como una forma especial de reacción del huesped frente al tumor,si tenemos en cuenta que los pacientes no tumorales no presentan este tipo de reacción en sus linfáticos.WATERMAN (1958) también pudo observar la correlación entre histiocitosis sinusal y una mayor supervivencia en el cancer de mama, en cambio DI RE y LANE (1963) en un estudio similar no obtienen los mismos resultados.MALICKA (1971) aplicando esta idea en pacientes con carcinoma de laringe encuentra que existe una estrecha correlación entre histiocitosis sinusal y supervivencia.Por el contrario BENNETT (1971) no confirma los resultados de MALICKA (1971) en el carcinoma de laringe e hipofaringe,aunque si observa una tendencia no comprobada estadisticamente hacia una mayor supervivencia en pacientes con histiocitosis sinusal en sus adenopatias.

TSAKRAKLIDES (1973) aplicando estos mismos criterios en pacientes afectos de cancer de cuello uterino y como consecuencia de un mejor conocimiento de la distribución de las células linfoides en el ganglio linfático es capaz de distinguir cuatro patrones histológicos:1) predominio linfocitario,2) predominio de folículos germinales,3) falta de estímulo, y 4) depleción linfocitaria.

BERLINGER (1976) establece una clara relación entre pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello y los cuatro patrones histológicos anteriormente referidos,siendo los resultados superponibles salvo en el hecho de presentar una mayor supervivencia en relación con el patrón dos.

Recientemente RING (1985) aplica los criterios de TSAKRAKLIDES (1973) a un grupo de 43 carcinomas de la cavidad oral con resultados similares a los de este autor.Estos resultados son de una gran importancia práctica ya que relacionan directamente supervivencia y patrón histológico ganglionar sin tener en cuenta en ningún caso otros factores como el tamaño,localización,repercusión funcional,tipo anatomopatológico o estadio del tumor primario,ni con el tamaño,localización o número de adenopatias.

Para DEMARD (1987) los patrones histológicos de los ganglios cervicales serian :1) ausencia de estímulo,2) buena actividad inmunitaria global,3) predominio de la inmunidad celular,cuando hay hipertrofia de la región paracortical,muy rica en limfocitos T, y 4) predominio de la inmunidad humoral cuando hay abundantes centros germinales en la zona cortical externa.

Para este autor no existe relación alguna entre tipo histológico ganglionar y estadio tumoral (clasificación TNM según la UICC 1979);grado histológico y localización del tumor primario;y la presencia de extensión extracapsular.

OPHIR (1987) publica dos casos de reacción granulomatosa atribuibles a tumores laringeos de localización supraglótica.En el estudio de las múltiples adenopatias aisladas sólo en un

ganglio se hallaron metástasis y en el resto reacción epitelioide.Es importante resaltar que este tipo de reacción se suele encontrar en presencia de tumores malignos que ya han dado metástasis cervicales previas por lo que posiblemente se trate de una forma peculiar de reaccionar frente a productos metabólicos o de desintegración del tumor.E n algunos casos esta reacción es tan vigorosa que los macrófagos destruyen por completo la célula tumoral y por tanto no hay necrosis.

Este hallazgo,poco relevante desde el punto de vista anatomopatológico,es importante en la clínica,ya que en ciertos casos podria comportarse como peligroso enmascarador si ante un diagnóstico de granuloma de células epitelioides filiamos el proceso de linfadenitis granulomatosa de forma sistemática descartando desde ese momento la posibilidad de una etiologia tumoral.

1-7.-Concepto de patologia cuantitativa.Fundamentos de morfometria fotometria y análisis de imagen.

Desde finales de los años 70 y principios de los 80 el estudio anatomopatológico del cancer en general se ha visto enriquecido por la aparición de métodos que permiten objetivar y cuantificar caracteristicas histológicas de la célula tumoral,que la diferencian de la célula normal del tejido de origen y que no podrian ponerse de manifiesto de no contar con una tecnologia adecuada de reciente desarrollo.

La aparición de la morfometria,citofotometria,citofluorometria de flujo y el análisis de imagen ha supuesto una autentica revolución en el campo de la anatomia patológica ya que permiten medir lo que hasta ahora sólo podia valorarse comparativamente.De esta forma la patologia tradicional cualitativa se convierte en patologia cuantitativa.

Todas las técnicas referidas anteriormente se basan en el estudio de las caracteristicas morfométricas y densitométricas del nucleo celular.Los resultados se relacionan con el contenido de DNA nuclear en una población de células tumorales tomando como referencia los valores obtenidos con el mismo sistema en los nucleos de células normales.Cuanto más se aparten estas medidas de sus correspondientes normales mayor será la agresividad del tumor y peor el pronóstico del paciente.

1-7-1.-Morfometria.

Mediante la morfometria pueden conocerse el diámetro mayor y menor del nucleo

celular,su superficie,perimetro,volumen y la medida en que la forma nuclear se aparta de la de una circunferencia del mismo radio que el nucleo celular (factor de forma) la mayor variabilidad de los resultados seria indice de pleomorfismo nuclear y el aumento de sus valores absolutos con respecto a los de nucleos de células normales sugeriría un mayor contenido y por tanto una actividad prolifrativa más intensa (MIGNOT 1981,BARRES 1985,KALTER1986).

1-7-2.-Fotometria.

La fotometria básicamente consiste en hacer pasar un rayo de luz a través de los nucleos celulares de preparaciones histológicas teñidas con técnicas especificas para el DNA (FEULGEN y ROSSENBECK 1924).Parte de la luz será absorbida por el nucleo y parte atravesará la preparación.Tanto la luz absorbida como la transmitida son medidas indirectas del contenida de DNA nuclear (GROVE 1979,GONDORF 1978,HOFSTADTER 1984,HELLQUIST 1981,BÖKING 1985).

El mismo método puede emplearse con tinciones no especificas del DNA.De esta forma se mide la densidad nuclear en función de la afinidad del colorante empleado por el material nuclear en su conjunto y no sólo del DNA.Ciertamente es un método menos exacto pero con el que también se obtienen resultados altamente significativos.Se emplea en estudios prospectivos en los que el proceso de preparación histológica puede llevarse a cabo de forma homogenea (JAKOWSKI 1971,ZASICECK 1972).

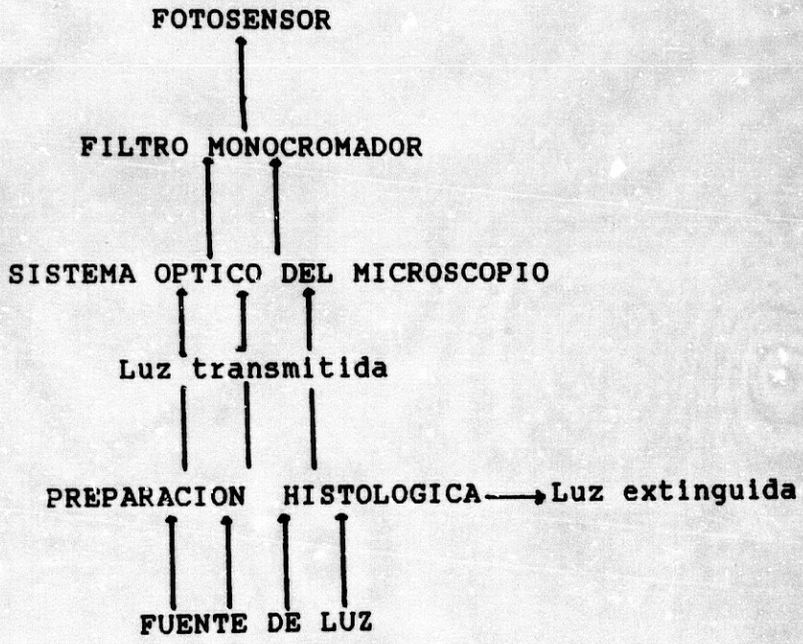
En esta linea y con el objeto de poder usar material de archivo se han introducido factores de corrección capaces de homogeneizar los resultados obtenidos en cada una de las preparaciones estudiadas (ESQUIVIAS 1986,ESQUIVIAS 1987).

En microfotometria se utiliza un dispositivo (fotosensor)que recoge las ondas luminosas y las traduce en medidas eléctricas.A dicho fotosensor (fotocátodo)llega un flujo radiante que se transforma en corriente eléctrica,la cual mediante pasos sucesivos multiplica su potencial para mover un indicador de voltaje.Es decir,el fotocátodo es impresionado por una"unidad de flujo radiante".La sensibilidad del fotocátodo viene expresada por la corriente eléctrica que puede medirse a su salida.Esta medida se amplia por un sistema de diodos (PILLER 1977)(Esquema2).

La luz que se usa en los microscopios comerciales tiene una longitud de onda que oscila entre 250 y 1.100nm.La radiación ultravioleta se encuentra comprendida entre 250 y 400 nm;la luz visible entre 400 y 700 nm; y la infraroja entre 700 y 1.100 nm.Lo que se mide en fotometria microscópica es la longitud de onda de una radiación que depende de la luz emitida por la fuente luminosa,del sistema óptico y mecánico del microscopio y naturalmente del objeto de estudio.

El filtro de color aisla una banda de ciertas longitudes en cualquier grupo de los citados anteriormente dejando pasar sólo esa amplitud.Una banda ancha basta para estudiar propiedades ópticas que varien dentro del correspondiente territorio lumínico vibrante:estudios densitométricos o fotométricos.

Para saber la corriente que emanará de un fotocátodo es preciso conocer los factores que modifican la marcha de los rayos dentro del microscopio.Todos ellos forman parte del flujo radiante que se expresa en watios de energia eléctrica (W).Estos factors son:


FOTOSENSOR
FILTRO MONOCROMADOR
SISTEMA OPTICO DEL MICROSCOPIO
Luz transmitida
PREPARACION HISTOLOGICA
Luz extinguida
FUENTE DE LUZ

ESQUEMA 2

1-potencia inicial de la lámpara,densidad espectral de la radiación P;expresada en W.cm2.sr(sterradianes).nm(nanometros).Cada tipo de lámpara tiene su valor P.

2-amplitud espectral A que se expresa en nanometros

3-volumen del sistema óptico que atraviesa el flujo radiante,al que se denomina"flujo óptico" (FO),expresado en cm2.sr .Se trata de una cantidad geomégrica abstracta aplicada al volumen por el que pasa la luz que se define.ZIMER (1973) la llama"tubo de luz" ya que ,en general,se trabaja con secciones circulares del microscopio.

4-transmitancia total del sistema óptico (T).Entendemos por transmitancia la fracción de luz neta,es decir,la que queda libre después de las naturales pérdidas en el haz primitivo por absorción,reflexión,dispersión y difracción;dicho de otro modo,es la medida de la luz que permaneció libre despues de que el haz luminoso atravesara todos los componentes ópticos del aparato,incluido el objeto de estudio colocado entre los sitemas de iluminación y formación de la imagen.

5-factor de interacción.Las acciones mutuas entre el objeto y la iluminación se diversifican en absorción,reflexión especular y difusa,fluorescencia,interferencia,refracción y difracción.

El factor de interacción se refiere a la medida de cualquier propiedad del objeto examinado proporcional al flujo luminoso que recibe.

La LEY FOTOMETRICA FUNDAMENTAL DEL MICROSCOPIO es:

$$FR=P.A.FO.T.IF$$

donde FR=flujo radiante,P=potencia de la lámpara,A=amplitud espectral,FO=flujo óptico,T=transmitancia total y FI=factor de interacción.

Normalmente en fotometria se utilizan comparaciones de dos flujos radiantes:el que resulta del choque de la luz con el objeto problema y el que depende del choque de la luz con el objeto de referencia o testigo.

La constante instrumental (C) es:

$$C=P.A.FO.T$$

debiendo mantenerse igual para ambas medidas.Los componentes de C deben estar en manos del observador y comprobar siempre sus valores.

Así el factor de interacción es proporcional al flujo luminoso que recibe,midiendo su valor el galvanómetro.

Estos sistemas fotométricos o densitométricos han sido automatizados tanto en su aspecto funcional como en el archivo de datos fotométricos,organizándose configuraciones controladas por ordenador de listados densitométricos,mapas densitométricos y valores

integrados.

1-7-3.-Citofotometria de flujo.

En la citofotometria de flujo el tejido a estudiar se somete primero a la acción de enzimas líticos,lo que permite la obtención de células sueltas que posteriormente se aislan por centrifugación.El fundamento es muy parecido al de la fotometria con la diferencia de que el objeto de estudio es un flujo celular y no una preparación histológica convencional.

En la citofluorometria de flujo los nucleos celulares se tiñen con colorantes tales como el acetato de fluoresceina,que produce fluorescencia verde o el propidium iodido,de fluorescencia roja.Durante el paso del flujo celular se realza la fluorescencia con un haz luminoso excitador.La fluorescencia medida también es un indicador indirecto del contenido del DNA nuclear.Comparando la fluorescencia de las células tumorales con sus correspondientes normales o con células normales de referencia puede calcularse la proporción de células euploides (en fase Go y G1) tetraploides (fases G2 y M) o hiperploides.

Una alta proporción de células aneuplides seria indicativo de una mayor capacidad proliferativa y signo de pronóstico desfavorable(BARLOGIE 1983,HARTMAN 1980,CRISSMAN 1980,DIXON 1980,CULPIN 1985,STRAGIER 1987,MACARTNEY 1986,BERLINGER 1987).

1-7-4.-Análisis de imagen.

Si consideramos al patólogo como un experto en el diagnóstico morfológico a través de la

imagen histológica microscópica no es de extrañar que en la era de la informática se intente facilitar su labor desarrollando sitemas de análisis automático y semiautomático.Estos sistemas tienen la capacidad de representar cada punto de la imagen real con valores numéricos distribuidos en un eje de coordenadas,obteniéndose de esta forma una matriz digital sobre la que pueden aplicarse complejas operaciones matemáticas(FERRER-ROCA 1988,MARCHEWSKY 1987,FALLON 1979,RASCH 1979).

El analizador de imagen puede ser automático o semiautomático.Se diferencian porque en el último caso se necesita un operador especializado llamado "interactivo periférico" que selecciona previamente los elementos de la imagen que interesan para un estudio determinado.

En anatomía patológica se emplean fundamentalmente los sistemas semiautomáticos para estudios morfométricos y densitométricos.

El equipo de morfometria y densitometria interactica consta de un computador,videocámara y videomonitor,sistema de almacenamiento de datos y el interactivo periférico.

El computador a su vez está compuesto por:

1-un sistema convertidor de señales analógicas en digitales y de digitos en señales analógicas.

2-un "sistema amortiguador".

3- un "hardware" auxiliar.

Se define como señal analógica la que varia de forma continua,es decir,la que no tiene ningún valor definido entre los límites de la distribución.Señal digital es la que varia de forma discreta a lo largo de niveles definidos entre los posibles de su rango.Digitalización es el proceso de cuantificación de una señal analógica.El analógico digital es un instrumento que convierte señales analógicas (generalmente voltajes) en números (dígitos) o en equivalentes numéricos.El digital analógico hace lo contrario.Mediante el analógico digital la imagen real recogida en la videocámara puede almacenarse en el "sistema amortiguador" en forma de matriz de representación y procesarse en el computador.Mediante el digital analógico una matriz de representación procesada puede representarse en el videomonitor.

Una imagen en blanco y negro no es más que una sucesión de lineas paralelas.Cada linea consiste en una serie de distintas intensidades de luz que el ojo humano ve como niveles de gris.El analógico digital divide cada linea en un número determinado de puntos de luz llamados elementos de imagen o"pixels" y asignan un valor numérico a cada nivel de gris dependiendo de la cantidad de voltaje que lo genera.De esta manera el analógico digital transforma la imagen en filas e hileras de números que pueden procesarse en el computador (matriz de representación).

La mayor parte de los analógicos digitales aceptan 512 lineas de 512 "pixels" cada una.Si la cámara ofrece más lineas el exceso puede ignorarse.

Para el digital analógico es importante el número de niveles de gris que es capaz de resolver,lo cual depende a su vez del número de "bits" de conversión.Por ejemplo un digital analógico con 6 "bits" puede resolver 64 niveles de gris,la escala completa va desde el negro (nivel 0) hasta el blanco (nivel 63 de gris;del 0 al 63 son 64 niveles de gris).Actualmente muchos digitales analógicos pueden resolver 8 "bits" (256 niveles de gris) que exceden la capacidad de discriminación del ojo humano.

El tiempo de conversión de un digital analógico moderno es de alrededor de un tercio de segundo.

El sistema amortiguador es simplemente una memoria adicional conectada a la salida del analógico digital y al computador.Este sistema amortiguador es capaz de almacenar de forma instantanea,en un momento dado la matriz de representación correspondiente a una imagen.

Un buen sistema amortiguador es capaz de almacenar una matriz numérica completa en aproximadamente un tercio de segundo lo cual permite al operador congelar una determinada imagen (matriz numérica) para su procesamiento.

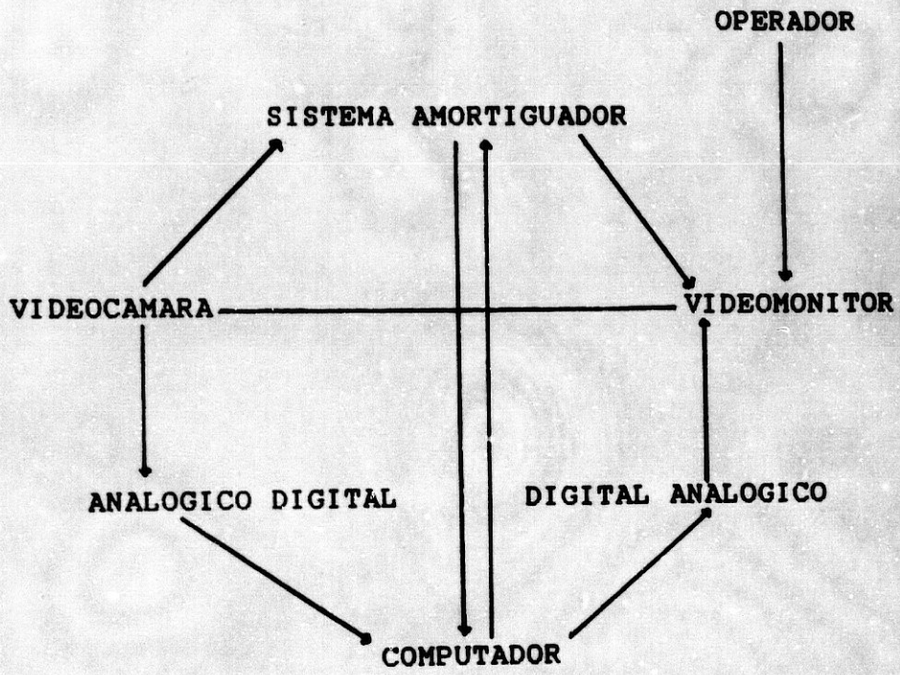
El "hardware" auxiliar es un sistema capaz de desarrollar de forma rápida operaciones que frecuentemente son necesarias en el proceso de análisis de imagen.Estas generalmente son:

-obtención de histogramas.Obtiene histogramas en donde se cuantifica el número de "pixels" en cada nivel de gris.

-"feature extractor".Que a diferencia del anterior no cuantifica sino que localiza los"pixels" con determinado nivel de gris.

-tablas de realzamiento de imagen o "look-up tables".Con las que pueden hacerse corresponder un conjunto de valores con otro grupo de valores numéricos seleccionado arbitrariamente.De esta forma puede modificarse la imagen original o resaltar ciertas características de la misma,por ejemplo,obtener negativos o imágenes de falso color,es decir,representar determinado nivel de gris con un color para que así sea más fácilmente distinguible por el operador.

-unidad aritmética.Es un sistema que lleva a cabo operaciones matemáticas en areas idénticas de varias imágenes almacenadas en el sistema amortiguador (suma,sustracción o promediación de dos imágenes).Para ello se necesita un equipo con más de un sistema amortiguador(Esquema 3).


OPERADOR
SISTEMA AMORTIGUADOR
VIDEOCAMARA
VIDEOMONITOR
ANALOGICO DIGITAL
DIGITAL ANALOGICO
COMPUTADOR

ESQUEMA 3

2 OBJETIVOS

La patologia tumoral de laringe ha sido ampliamente estudiada y desde muchos puntos de vista:etiológico,epidemiológico,diagnóstico,anatomopatológico;de ellos es sin duda el anatomopatológico el que más aporta en cuanto al conocimiento profundo y estructura íntema del tumor.Son constantes los esfuerzos de múltiples investigadores por encontrar la relación existente entre los hallazgos puramente histológicos y la evolución posterior de la neoplasia;se trata de "leer" sobre la preparación el futuro comportamiento del tejido en estudio.

Desde finales del siglo XIX y principiosdel XX hasta nuestros dias el patólogo ha seguido fiel a su método:procesamiento previo del material biológico,obtención de secciones finas de tejido,tinción y observación microscópica;llegado a este punto el especialista compara cualitativamente lo observado en ese momento con la experiencia acumulada a lo largo de su aprendizaje a partir de preparaciones similares.Con este procedimiento y si es necesario con una amplia base bibliográfica emite un diagnóstico y apunta un posible pronóstico.

En el caso concreto del cancer laringeo el estudio queda reducido en la mayoria de los casos a la identificación del tipo histológico y a alguna referencia al grado de diferenciación.

Desde finales de la década de los setenta y gracias al desarrollo de tecnologias que lo han hecho posible,surge el concepto de patologia cuantitativa.No se trata ya de comparar caracteres histológicos meramente cualitativos sino de medir aquellos que nos permiten conocer de una forma más profunda y cientifica la neoplasia en sí,su comportamiento posterior y la evolución clínica del

paciente en cue tión.

El presente trabajo consiste fundamentalmente en la aplicación de alguno de estos métodos cuantitativos concretamente la morfofotometria y la densitometria interactiva en el estudio del cancer laringeo con el objetivo de comprobar lo que son capaces de aportar comparados con los más recientes hallazgos de la patologia tradicional en esta materia.

No es ,por tanto,sólo un estudio descriptivo sobre poblaciones celulares de cancer laringeo,sino que se intenta además establecer una relación lo más estrecha posible y hasta ahora no investigada,entre las medidas obtenidas con los métodos descritos anteriormente y el comportamiento clínico de los tumores de esta localización.

3 MATERIAL Y METODOS

3-1.-Material.

3-1-1.-Preparaciones de archivo.

Se han revisado 75 casos de carcinoma epidermoide de laringe procedentes del servicio de Anatomia Patológica del Hospital "Virgen de las Nieves" de Granada desde Junio de 1980 hasta Octubre de 1983.

En total se examinaron 1045 preparaciones histológicas correspondientes a los 75 pacientes.Cada uno de los 75 casos se codificó con un número distinto al que tenian en el archivo,constatándose en hoja aparte:nombre,edad,dirección,localidad,fecha de la intervención,tipo de intervención,tratamiento prequirúgico,tratamiento postquirúrgico y número de ficha anatomopatológica.Los datos se recogieron de la historia clínica,39 de las cuales se obtuvieron del archivo de historias clínicas de nuestro hospital en Granada y 36 de la Residencia Torrecárdenas de Almeria,lugares en donde se llevó a cabo la intervención quirúgica (Tabla 3).

3-1-2.-Microscopio.

Todas las preparaciones fueron examinadas con un microscopio Leitz Dialux 20 EB con objetivos 160/-EF 4/0,12;160/-EF 10/0,25;160/0,17 EF 40/0,65;160/0,17 EF 100/1.250 EL.

3-1-3.-Fotografia de los cortes.

Con un accesorio Wild photoautomat MPS 45 adaptado al microscopio Dialux 20 EB,el cual lleva incorporado un chasis intercambiable adaptado a un

Tabla 3.-Listado general de datos clinicos.

Num.	Num.A.P.	Edad	TNM	Borde Q.Libre	D.Mayor Adenop.	Adenop. Metast.	Superv
1	11855/81	71	T3N0M0	S	0.0		7
2	8752/83	70	T3N0M0	S	9.0		60
3	10846/81	37	¿	S	0.0		72
4	9090/83	61	T3N0M0	S	0.0		60
5	17872/82	56	T3N2AM0	¿	0.7		20
6	9004/83	70	T4N0M0	S	0.0		38
7	10950/83	75	T2N2AM0	¿	0.0		6
8	8949/82	67	T4N0M0	¿	0.0		30
9	11667/83	70	T3N0M0	S	0.0		60
10	6178/83	57	T3N0M0	S	1.5		60
11	3670/83	51	T3N0M0	N	0.0		19
12	16402/81	52	T4N2AM0	¿	1.0		84
13	13800/83	63	T3N0M0	S	0.0		60
14	15640/82	71	T3N0M0	S	0.0		60
15	15752/81	67	T2N0M0	S	0.0		84
16	11903/80	49	T4N1M0	S	2.0		60
17	6842/81	65	T3N0M0	S	0.0		9
18	10893/81	62	T3N0M0	¿	0.0		72
19	12270/80	70	T2N0M0	S	0.0		0
20	15101/80	70	T2N0M0	S	0.0		0
21	9758/80	63	T4N0M0	S	0.0		47
22	3344/82	52	T2N0M0	S	1.5		60
23	14373/82	69	T3N0M0	S	0.0		60
24	13817/82	58	T4N0M0	N	0.0		9
25	8606/81	50	T4N0M0	N	0.0		4
26	16332/80	52	T2N0M0	S	0.5		60
27	12206/81	75	T2N0M0	S	0.0		60
28	8187/80	45	T4N2AM0	I	2.5		6
29	568/81	65	T3N0M0	S	1.0		0
30	12453/81	72	T3N0M0	S	0.0		60
31	4371/83	56	T3N0M0	S	1.2		0
32	4574/82	68	T4N0M0	¿	1.5		12
33	3821/82	59	T4N0M0	¿	1.5		72
34	17437/80	52	T2N0M0	S	1.5		60
35	1953/81	49	T3N0M0	S	1.5		60
36	14295/82	62	T2N0M0	¿	1.5		0
37	16281/80	64	T4N1M0	¿	2.5		0
38	788/82	44	T3N1M0	S	1.8		6
39	16186/81	43	T2N0M0	S	0.0		0
40	8536/82	69	T3N0M0	¿	0.0		0
41	7711/80	68	T3N0M0	S	0.0		0
42	T2N0M0	55	T2N0M0	S	2.5		0
43	10104/80	56	T3N1M0	¿	2.0		0
44	1633/82	48	T3N0M0	S	0.0		15
45	12657/82	50	T3N0M0	¿	2.5		24
46	9715/80	54	T3N0M0	S	0.0		0
47	2388/81	54	T3N1aM0	S	1.5		0

Tabla 3.-Listado general de datos clinicos.

Num.	Num.A.P.	Edad	TNM	Borde Q.Libre	D.Mayor	Adenop. Metast.	Superv
48	16119/81	56	T4N0M0	¿	1.0		0
49	16594/80	61	T3N0M0	N	1.5		0
50	16047/81	52	T4N0M0	¿	0.0		0
51	12443/83	56	T2N0M0	S	0.0		60
52	13623/81	56	T1N0M0	S	1.3	0/5	84
53	19476/81	69	T2N0M0	¿	0.0		24
54	10702/81	55	T1N2AM0	S	2.0	3/9	0
55	11852/80	55	T2N0M0	S	1.0	0/1	60
56	1072/81	48	T4N2AM0	N	3.5	5/9	16
57	12370/80	53	T2N1BM0	¿	0.8	0/7	96
58	10893/80	69	T3N0M0	S	0.0		9
59	15041/80	59	T2N1BM0	¿	1.5	0/7	0
60	8920/80	68	T4N2AM0	S	0.0	0/24	72
61	16152/81	32	T4N2BM0	I	2.5	4/18	0
62	19692/81	56	T3N0M0	S	2.0	0/9	0
63	18781/81	65	T3N0M0	¿	0.0	0/4	84
64	16710/81	49	T2N1BM0	¿	2.2	2/13	48
65	11430/81	77	T3N1M0	S	0.0	1/10	0
66	11698/81	43	T4N0M0	S	1.0	0/8	3
67	13231/81	69	T2N0M0	S	0.0	0/38	84
68	4956/81	70	T3N0M0	I	0.0	0/2	48
69	8126/81	52	T3N2AM0	I	1.0	2/16	11
70	6962/81	72	T3N0M0	S	0.0	0/8	24
71	1472/81	48	T3N1BM0		2.5	2/10	84
72	4310/81	37	T3N1BM0	¿	1.5	2/7	4
73	14508/49	49	T2N0M0	¿	2.0	0/12	84
74	11885/81	68	T3N1AM0	S	2.0	1/2	36
75	854/81	55	T3N0M0	S	1.3	0/10	0

*** Total ***

cuerpo de cámara PPS 51 S (Leitz),se realizaron diapositivas de algunos de los cortes estudiados.Dichas diapositivas se hicieron con cámara AGFACROME 50L PROFESSIONAL mientras que las copias en papel AGFA se realizaron con película vericolor III.

3-1-4.-Fotómetro.

Para llevar a cabo el estudio morfofotométrico se empleó un fotómetro MPV 2 para microscopio,de marca Leitz adaptado a un microscopio Leitz Ortholux II usando un filtro monocromador 541-22 (Lámina 6,Fig.a)

3-1-5.-Analizador de imagen.

Se realizó con el sistema IBAS-IPS (Sistema Interactivo de Análisis de Imagen).El equipo utilizado consta de (Lámina 6,Fig.b):

-videocámara BOSCH TYK-92 con un objetivo SMC PENTAX-A MACRO 1:2,4;50 mm.

-videomonitor de imagen KONTRON M-14 con pantalla POLAROID cp-50.

-videomonitor de programación KONTRON M-15 con pantalla POLAROID cp-50.

-procesador de imagen KONTRON SEM IPS.

-procesador de datos KONTRON SEM IPS.

-teclado.

LAMINA 6

FIG.a.-El fotómetro MPV 2 empl ado para el estudio morfofotométrico

FIG.b.-Analizador de imagen IBAS-IPS

-tablero digitalizador con lapiz magnético.

El equipo empleado admite imágenes de 512 lineas paralelas de 512 "pixels" cada una,con un formato de digitalización por tanto de 262.144 "pixels".

El digital analógico es de 8 "bits" de conversión,es decir es capaz de resolver 256 niveles de gris por "pixel".

3-1-6.-Ordenador.

Para el almacenamiento y tratamiento de los datos,asi como para el cálculo estadistico se empleó un ordenador PC/XTCPV 512K con disco duro de 20 MB,teclado BTC 50-50,monitor SAMSUNG MD-12 786 (SM-12 SF A7) e impresora ELBE MYCROSYSTEM.

3-2.-Métodos.

3-2-1.-Métodos histológicos.

Como se ha mencionado anteriormente todas las preparaciones histológicas estudiadas proceden del archivo general del servicio de Anatomia Patológica del Hospital "Virgen de las Nieves",habiendo sido procesadas en su dia mediante fijación en formol al 10% e incluidas en parafina,cortadas a un espesor de 4 a 6 micras,teñidas con hematoxilina de Harris y eosina,posteriormente deshidratadas y aclaradas en alcohol y xileno y por fin montadas con bálsamo del Canadá.

Por la repercusión que va a tener en el presente trabajo,es preciso considerar en profundidad el mecanismo de acción de la hematoxilina durante la coloración nuclear,ya que es precisamente el cromatismo nuclear el principal factor que se

analiza mediante citomorfofotometria.

La hematoxilina de Harris está compuesta por una solución alcohólica de hematoxilina,óxido de mercurio y sulfato alumínico potásico (alumbre potásico) que actua como mordiente.Las lacas formadas entre la hemateina y el alumbre poseen una fuerte carga positiva,comportándose como potentes colorantes básicos lo que explica su fijación sobre los ácidos nucleicos.

Las condiciones teóricas necesarias para la realización de una reacción basófila en histoquímica son esencialmente dos (GANTER y JOLLES 1969;LISTON 1960):

1)los grupos ácidos del sustrato deben estar ionizados,por ello la reacción debe producirse en condiciones particulares de pH.Si la concentración de iones H+ es alta,es decir,el pH es bajo el número de radicales ácidos ionizados disminuye,en caso contrario aumenta.

Se designa como pK el pH al que una sustancia se encuentra ionizada en un 50%.Este pK es variable según las sustancias:para las proteinas el pK de los grupos carboxílicos es de alrededor de 2;por debajo de este valor el número de grupos ionizados dismunuye y la afinidad por los colorantes básicos se debilita.Se ve pues la considerable importancia de las condiciones del pH en la tinción de una sustancia por un colorante básico.

2)la fijación del colorante catiónico por los grupos ácidos ionizados del sustrato no debe ser obstaculizada por los grupos básicos ionizados de ese mismo sustrato susceptibles de entrar en

competición con las moléculas del colorante , esta competición tiene el riesgo de neutralizar los grupos ácidos e impedir la fijación del colorante básico.

Desde el punto de vista químico el nucleo celular contiene (GANTER Y JOLLES 1969;BARGMAN 1968):

DNA	9%
RNA	1%
PROTEINAS ACIDAS	65%
PROTEINAS BASICAS	11%
ENZIMAS, MUCOPOLISACARIDOS, MINERALES	14%

el componente catiónico de los colorantes básicos se une al grupo fosfórico de los ácidos nucleicos,al grupo carboxílico de las proteinas y a los grupos carboxílicos y sulfatos ácidos de los mucopolisacáridos por un simple mecanismo de atracción electrostática entre cargas contrarias.Por ello la hematoxilina se fijará a los ácidos nucleicos,a las proteinas ácidas y a los mucopolisacáridos del nucleo,que representan el 10,65% y una cantidad indeterminada respectivamente de la composición nuclear.

En las preparaciones procedentes de archivo no es evaluable el pH al que se han efectuado las tinciones y tampoco se han podido controlar el número de grupos ácidos y básicos ionizados.Además el grosor de las preparaciones y el tiempo de tinción en cada una no son idénticos por todo lo cual la utilización de factores de corrección adecuados es imprescindible.

3-2-2.-Parámetros histológicos

estudiados.

De cada uno de los 75 casos se observaron los siguientes datos anatomopatológicos:

-tamaño y localización del tumor primario

-estadio clínico siguiendo la clasificación TNM sgún la AJCC (1977)

-tipo de crecimiento macroscópico exofítico o infiltrante

-grado de diferenciación anatomopatológica del tumor en base al porcentaje aproximado de células bien,moderadamente y pobremente diferenciadas (Lámina 1,Fig.a,b y c).

-grado de queratinización para lo cual se siguió el proceder de HOLM (1982) de clasificar cada caso según la cantidad de queratina estimada en abundante,moderada,escasa o ausente,asignándole los valores 1,2,3 y 4 respectivamente (Lámina 2,Fig. a).

-infiltración linfoide según sea :marcada,moderada,escasa o ausente,asignando a cada uno de estos grupos los valore 1,2,3 y 4 respectivamente (HOLM 1982)(Lámina 3,Fig.f,e y b).

-tipo de crecimiento microscópico:expansivo (o) o infiltrante (2)(Lámina 1,Fig.e y f).

LAMINA 1

FIG.a.-Carcinoma epidermoide bien diferenciado

FIG.b.-Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado

FIG.c.-Carcinoma epidermoide pobremente diferenciado

FIG.d.-Distinción de los estratos basal,intermedio y superficial en una preparación de carcinoma epidermoide laringeo.

FIG.e.-Crecimiento exofítico

FIG.f.-Crecimiento infiltrante

LAMINA 2

FIG.a.-Abundante queratinización

FIG.b.-Microinvasión vascular.Embolo tumoral en un vasc sanguineo

FIG.c.-Carcinoma epidermoide pobremente diferenciado con areas de "spindle cell carcinoma"

FIG.d.-Fibrosis abundante.(Hematoxilina-eosina)

FIG.e.-Fibrosis abundante.(Tricrómico de Masson)

FIG.f.-Necrosis celular

LAMINA 3

FIG.a.-Extensión extracapsular a la grasa perilinfática.

FIG.b.-Escaso infiltrado linfoide peritumoral

FIG.c.-Embolo tumoral en un vaso linfático de la cápsula ganglionar.

FIG.d.-Infiltración peritumoral moderada

FIG.e.-Metástasis ganglionar.

FIG.f.-Infiltrado peritumoral abundante

-cantidad de fibras del estroma:escasa(o),moderada(1) y abundante(2)(Lámina 2 Fig.e,f)

-presencia o ausencia de microinvasión vascular(Lámina 2,Fig.b)

-presencia o ausencia de infiltración perineural

-necrosis:escasa (1),moderada (2) y abundante (3)(Lámina 2,Fig.f)

-número de mitosis por cada 10 campos de gran aumento (40x)(Lámina 5,Fig.e)

-número de adenopatias metastásicas,total de adenopatias estudiadas,presencia o no de estensión extracapsular y patrón histológico ganglionar siguiendo la clasificación de RING (1985)(Lámina 3,Fig. e,a):

-predominio linfocitario(Lámina 4,Fig.a)

-histiocitosis sinusal(Lámina 4,Fig.d,e)

-depleción linfocitaria(Lámina 4,Fig.b)

-predominio de folículos germinales(Lámina 4,Fig.c)

-tamaño de la mayor adenopatia metastásica

LAMINA 4

FIG.a.-Predominio linfocitario

FIG.b.-Depleción linfocitaria

FIG.c.-Predominio de folículos linfoides

FIG.d.-Histiocitosis siusal

FIG.e.-Histiocitosis sinusal a mayor aumento

-clasificación histológica por estadios siguiendo los mismos criterios que para la clasificación clínica

-supervivencia a los cinco años.

Cada caso fue ampliamente discutido con el doctor Esquivias Lopez-Cuervo del servicio de anatomia patológica del Hospital "Virgen de las Nieves"(Tabla 4).

Las células tumorales del estrato basal son de forma redondeada,de citoplasma no bien limitado en la tinción con hematoxilina eosina,de nucleo denso,grande,también redondeado u ovoide y dispuestas de forma que el eje predominante es el vertical.En el otro extremo la célula superficial es alargada,de eje predominante horizontal,también de límites citoplasmáticos mal definidos y de nucleo menos denso,ovoide y de menor tamaño.

Considerando que cada célula del estrato basal sufre un proceso de maduración progresiva al tiempo que asciende a los estratos medios y superficiales,se tomaron como pobremente diferenciados aquellos tumores en los que la célula predominante tenia un aspecto histológico muy similar a las del estrato basal,moderadamente diferenciado cuando el tipo celular predominante es muy parecido al del estrato intermedio y bien diferenciado cuando son las células similares a las del estrato superficial las más abundantes(Lámina 5,Fig.a,b,c,d,e)

El grado de diferenciación se ha obtenido por tanto,a partir del porcentaje estimado de células que por su aspecto histológico sugieren buena, moderada o escasa maduración,siendo tumores bien diferenciados aquellos cuyo porcentaje estimado

LAMINA 5

FIG.a.-Estratos basal, intermedio y superficial de un epitelio laringeo plano poliestratificado normal

FIG.b.-Detalle del estrato basal e intermedio de un epitelio plano poliestratificado normal de laringe.Límite neto entre epitelio y estroma.

FIG.c.-Células tumorales del estrato superficial a gran aumento

FIG.d.-Células intermedias tumorales a gran aumento

FIG.e.-Células basales tumorales a gran aumento.Abundantes figuras de mitosis.

Tabla 4.- Listado general de datos histologicos.

Num.	Crecimiento (exofitico infiltrante)	%Celulas Bien dif.	%Celulas Mod.dif.	%Celulas Pobr.dif.	Q	I.L.	F	M	N
1	5	5	15	80	4	3	0	10	1
2	E	50	25	25	1	3	2	0	1
3	¿	10	55	35	2	3	2	21	1
4	E	25	60	15	1	0	2	9	1
5	E	5	40	55	2	6	2	14	3
6	I	0	0	100	3	6	2	94	2
7	E	0	0	100	4	3	2	60	2
8	E	5	5	90	3	0	2	10	1
9	E	45	30	25	1	0	1	15	1
10	I	10	60	30	1	0	2	19	1
11	I	50	40	10	4	6	1	12	1
12	E	10	80	10	1	3	2	6	3
13	I	20	60	20	2	0	2	11	1
14	¿	15	70	15	2	0	1	32	1
15	I	0	9	1	4	3	2	10	1
16	E	10	70	20	4	0	2	46	1
17	I	5	5	9	4	6	2	17	1
18	I	5	55	40	3	0	2	24	2
19	E	0	0	100	4	0	2	60	2
20	E	5	35	60	2	0	2	54	1
21	I	20	60	20	2	6	2	25	1
22	I	0	10	90	4	6	1	48	1
23	E	30	60	10	2	0	2	12	2
24	I	40	50	10	1	6	2	18	3
25	E	30	60	10	2	6	2	38	3
26	E	25	60	15	3	0	2	2	1
27	I	5	50	45	2	3	0	7	1
28	E	10	20	70	3	0	2	40	1
29	I	40	40	20	2	3	0	18	1
30	E	5	70	25	3	3	2	31	2
31	E	50	40	10	2	0	2	23	3
32	E	5	90	5	4	6	2	23	3
33	I	20	60	20	2	3	1	32	1
34	E	40	50	10	1	0	1	3	1
35	E	40	45	15	1	0	0	11	2
36	I	10	20	70	2	3	2	6	3
37	I	20	0	80	4	6	2	39	3
38	I	90	5	5	1	0	2	4	3
39	E	15	70	15	2	3	2	3	1
40	E	10	30	60	1	0	1	41	1
41	I	0	30	70	3	6	1	47	1
42	I	0	30	70	2	3	2	16	2
43	E	20	70	10	1	6	2	2	2
44	I	33	33	33	2	6	2	14	3
45	I	20	30	50	2	0	1	35	3
46	I	0	30	70	4	3	1	75	2

Tabla 4.- Listado general de datos histologicos.

Num.	Crecimiento (exofitico infiltrante)	%Celulas Bien dif.	%Celulas Mod.dif.	%Celulas Pobr.dif.	Q	I.L.	F	M	N
47	I	0	20	80	4	6	2	134	1
48	I	15	60	25	2	3	2	49	1
49	E	10	60	30	2	0	2	9	1
50	I	5	30	65	2	3	1	8	1
51	E	25	60	15	1	0	2	11	1
52	I	85	15	0	2	0	2	18	1
53	I	0	10	90	4	6	2	40	1
54	I	25	70	5	2	6	2	24	3
55	I	40	60	0	2	3	2	11	1
56	E	70	25	5	1	0	0	13	1
57	I	40	45	5	1	3	1	13	2
58	E	10	60	20	2	3	2	10	2
59	I	90	10	0	4	0	1	20	1
60	E	55	40	5	1	6	2	9	3
61	I	30	50	10	1	0	2	14	1
62	E	30	55	15	2	0	2	4	2
63	E	0	35	65	4	3	2	42	1
64	I	0	50	50	4	3	2	22	1
65	I	5	35	60	3	3	2	5	1
66	E	5	90	5	3	6	2	34	2
67	I	100	0	0	1	0	2	13	3
68	E	10	50	40	3	6	2	32	2
69	I	5	25	70	3	6	2	25	1
70	E	90	10	0	1	3	0	1	1
71	I	5	80	15	3	3	0	23	1
72	I	5	35	60	3	6	1	44	1
73	E	10	10	80	3	3	1	6	1
74	I	5	15	80	4	6	2	136	3
75	E	60	35	5	2	3	1	0	1

*** Total ***

de células que alcanzan una buena maduración es mayor del 50%,procediéndose de la misma forma para los moderadamente y pobremente diferenciados.

3-2-3.-Variable J.

Mediante la suma aritmética de los parámetros :grado de diferenciación,queratinización,infiltración linfoide,tipo de crecimiento,fibrosis del estroma y necrosis se obtuvo la variable "J" cuyos valores máximo y mínimo son 19 y 3 respectivamente(Tabla 1).

3-2-4.-Estudio morfofotométrico.

Se ha llevado a cabo en 50 de los 75 casos referidos anteriormente en la preparación histológica que se consideró más representativa del tumor primario.En cada caso se midieron los diámetros mayor y menor del nucleo celular así como el valor de extinción nuclear en un número de células igual al porcentaje estimado de las bien,moderadamente y pobremente diferenciadas hasta un total de 100.Las mismas medidas se tomaron en 25 células del estrato basal,50 del intermedio y 25 del superficial de cinco epitelios laringeos poliestratificados planos normales.Con objeto de aplicar factores de corrección se siguió el mismo procedimiento anterior sobre 30 nucleos linfocitarios por caso tanto tumoral como no tumoral cuya elección se hizo al azar.

3-2-4-1.-Análisis morfométrico.

Para llevarlo a cabo se considera que los nucleos de las células objeto de estudio y los de linfocitos tomados como referencia tienen una forma elipsoide.

Tabla 1. Parametros histologicos de la variable J.

DIFERENCIACION	>50% Bien dif.	0
	>50% Mod. dif.	2
	>50% Pobr.dif.	4
QUERATINIZACION	Abundante	1
	Alguna	2
	Minima	3
	Ausente	4
INFILTRACION LINFOIDE	Marcada	0
	Moderada	3
	Escasa	6
CRECIMIENTO	Expansivo	0
	Infiltrante	2
FIBROSIS	Escasa	0
	Moderada	1
	Abundante	2
NECROSIS	Escasa	1
	Moderada	2
	Abundante	3
J	Valor maximo	19
	Valor minimo	3

Con un ocular micrométrico adaptado al microscopio Leittz Ortholux II se miden los diámetros mayor y menor de los nucleos de células epiteliales y de los linfocitos.Con estos diámetros se calcula la superficie nuclear según la fórmula:

$$S=\pi *a/2*b/2$$

El ocular micrométrico usado,con un objetivo de 40x que es el que se empleó para efectuar las mediciones se correlaciona con una reglilla microgradуada de forma que cada cuatro unidades del ocular micrométrico corresponden a 10 micras.Por tanto cada valor medido con el ocular micrométrico fue multiplicado por 2,5 para expresar los diámetros medidos en micras.

La fórmula de la superficie nuclear será por tanto:

$$S=\pi *a*2,5/2*b*2,5/2$$

Ahora bien,en cada corte histológico los tejidos y por ende las células sufren una serie de alteraciones en su tamaño y forma debido a los procedimientos de fijación corte y tinción.Para que sean homologables todas las medidas se ha introducido un factor de corrección basándonos en el trabajo de FOSSA (1976),el cual para corregir el area nuclear media de las células transicionales de la vejiga aplica la siguiente fórmula:

$$A,e+Ae*(1-AL-A,L/AL*Ae)$$

En donde:
A,e=area nuclear de la célula epitelial corregida
Ae=area nuclear media de las células

epiteliales medidas

AL=area nuclear media de los granulocitos

A,L=area nuclear media de los granulocitos en todos los especímenes.

En la presente experiencia se ha empleado esta fórmula para calcular el area corregida de las células tumorales laringeas utilizando como elemento comparativo no granulocitos sino linfocitos y sustituyendo el factor Ae no por el area nuclear media de los núcleos de las células epiteliales medidas,sino por el area nuclear medida de cada una de las células epiteliales.

El area media de los linfocitos se calculó sumando todas las areas y dividiendo el resultado por el número de linfocitos medidos (n=30).

Otro dato que es preciso calcular es el area media de los linfocitos en todos los especímenes,para lo cual se halló la media aritmética del area de todos los linfocitos medidos en la experiencia (1.650).

Para calcular el area nuclear de cada célula epitelial corregida,se emplea la siguiente fórmula:

$$A'l=Al*(1-Sh-S,h/Sh*Al)$$

En donde :

Al=area nuclear medida de cada célula epitelial

A'l=area nuclear corregida de cada célula epitelial

Sh=area media de los linfocitos en cada caso

S,h=area media de los linfocitos en todos los especímenes.

El parámetro tamaño nuclear,empleado por algunos investigadores (SOTO 1982,VAN DER VALK 1982,BOON 1982) y que BOON (1982) ha expresado en la fórmula:

$$\text{Tamaño nuclear}=2*\sqrt{\text{Area}/\pi}$$

lo hemos calculado nosotros considerando que el area se refiere a la superficie nuclear de cada célula epitelial corregida.

Si se desarrolla esta fórmula sustituyendo el area por su equivalente:

$$\text{Area}=\pi*R*r$$

Eltamaño nuclear será:

$$\text{Tamaño nuclear}=2*\sqrt{\pi*R*r/\pi}$$

$$\text{Tamaño nuclear}=2*\sqrt{R*r}$$

con lo cual se demuestra que este parámetro tiene en cuenta los dos diámetros del nucleo celular.

3-2-4-2.-Análisis fotométrico.

El mecanismo por el cual actua el fotómetro MPV 2 que se ha empleado es, el siguiente:un fotosensor (fotocátodo) recoge las ondas luminosas y las traduce en medidas eléctricas.Al fotosensor (fotocátodo) llega un flujo radiante que se transforma en corriente eléctrica moviendo un indicador de voltaje.Es decir que el fotocátodo es impresionado por una unidad de flujo radiante.

Lo que se mide en fotometria microscópica es la longitud de onda de una radiación que depende:1)de la luz emitida por una fuente luminosa,2)del sistema óptico y mecánico del microscopio y 3) naturalmente del objeto de estudio.

La ley fotométrica fundamental del microscopio tal como se ha comentado anteriormente es:

$$FR=P*A*FO*T*IF$$

FR=flujo radiante
P=potencia de la lámpara
A=amplitud espectral
FO=flujo óptico
T=transmitancia total
IF=factor de interacción

El flujo radiante se convierte en energia eléctrica proporcional a la cantidad de luz.Esta energia eléctrica se mide con un galvanómetro designándose como G(PILLER 1977).

La potencia de la lámpara,la amplitud espectral,el flujo óptico del microscopio y la trnsmitancia de su sistema óptico van a ser siempre identicos.Por ello el flujo radiante que es igual a G

será también igual a:

$$FR=G=C*IF.$$

Con la finalidad de homologar unas preparaciones y otras se emplearon factores de corrección.Para ello se midieron dos flujos radiantes;uno es el que resulta del choque de la luz con el objeto problema,el otro es el que produce el choque de la luz con un objeto de referencia o testigo.La comparación de los dos flujos radiantes queda establecida así:

$$C*IFp/C*IFt=Gp/Gt=IFp/IFt$$

$$IFp=Gp/Gt*IFt$$

El objetivo problema son los nucleos de las células que se estudian.Como testigo se efectuaron medidas de los nucleos de 30 linfocitos en cada caso.

Los linfocitos normales son quiescentes.Tienen un ciclo vital de baja frecuencia (GORMAN 1984,FENSELAU 1976,SCHWARTZ 1978,RYAN 1978 MUELLER 1980) y no sufren modificaciones en su apariencia histológica en presencia del tumor que se estudia.Por ello consideramos que la intensidad de la tinción de los linfocitos y su variación de unas preparaciones a otras depende sólo de las condiciones fisicoquímicas en las que se produzca la tinción pero no del ciclo vital de la célula relativamente inerte,siendo por tanto su IF constante a los efectos que nos interesan haciéndolo igual a la unidad.

IFt=1

entonces:

IF=Gp/Gt

Los valores G los llamamos valores de extinción nuclear.Gp será el valor de extición nuclear medio de cada nucleo problema y Gt se corresponde con la media de los valores de extinción de los linfocitos usados como factor de corrección.

En total se tomaron medidas de más de 7150 células
de ellas 5572 fueron células epiteliales y el resto linfocitos(Tabla 2).

3-2-4-3.-Valor ET,H,X,Y,Z.

De cada una de las 5572 células epiteliales se obtuvieron las medidas del valor de extinción y del tamaño nuclear corregido.Como parámetro comparativo y de cálculo estadistico se tomó en todos los casos lo que llamamos variable ET que representa el producto del valor de extinción por el tamaño nuclear.

H es el resultado de multiplicar el valor de ET de cada una de las células basales por la variable J en cada caso y por el número de células basales en cada caso(c):

H=J*ETb*c.

Tabla 2.-Numero de celulas medidas

	MPV2	IBAS-IPS
C.tumorales	5000	3218
C.No tumorales	572	842
Linfocitos	1578	--
TOTAL	7150	4060

7150 + 4060

11210

X,Y y Z resultan de multiplicar el valor ET de cada célula basal,intermedia y superficial por el número total de células basales,intermedias y superficiales respectivamente,en cada caso.

3-2-4-4.-Grado de malignidad.

En un grupo homogeneo de 28 casos se aplicó la fórmula de BÖKING (1985) para el cálculo del grado de malignidad:

$$GM=3*\log(MI+1)/\log(MIa-MIb)$$

en donde GM=grdo de malignidad,MI=índice de malignidad y MIa y MIb son respectivamente los valores mayor y menor de MI en nuestra serie.

El índice de malignidad (MI) se calcula según la siguiente fórmula:

$$MI=5CER*2CDI$$

5CER representa el porcentaje de células definitivamente aneuplides o lo que es lo mismo,cuyo valor de ET es mayor o menor que la media del valor ET de las células intermedias normales +/- dos veces el valor de la desviación standard.2CDI corresponde a la media de las desviaciones cuadradas del valor ET de las células diploides (2C),tomando como valor 2C el valor medio de ET de las células intermedias de epitelios normales:

$$2CDI=1/N\sum_{i=1}^{n}(Ci-2C)*(Ci-2C)$$

siendo Ci el valor de ET de cada célula en cuestión.

3-2-5.-Análisis de imagen.

En 30 casos tumorales y 5 normales se llevó a cabo un análisis morfométrico y densitométrico de la imagen histológica más representativa con el sistema IBAS-IPS (Tabla 2).

La imagen de la preparación para la videocámara se obtuvo a través de un microscopio LEITZ DIAVERT 20 EB con objetivo 160/-EF 10/0'25;con el diafragma abierto por completo,sin condensador y con un filtro monocromador de 541-22 nm colocado inmediatamente por encima de la lámpara y ésta a la mayor intensidad de luz.El objetivo de la videocámara se mantuvo a su máximo aumento en todas las preparaciones.

El programa utilizado puede dividirse de forma resumida en las siguientes fases:

-TVON que activa la videocámara(Lámina 7,Fig.a)

-TVINP o almacenamiento de la imagen en forma de matriz de representación numérica en el sistema amortiguador o digitalizador.

-SHDEF que genera una nueva imagen empleada para una posterior sustracción.

-SHADE realiza la sustracción de la imagen almacenada y la generada en el paso anterior,para eliminar defectos de iluminación.

LAMINA 7

FIG.a.-Imagen en blanco y negro tal y como se ve en el videomonitor de imagen

FIG.b.-Selección manual de los nucleos con el lapiz magnético,con un halo de gris perinuclear

FIG.c.-Aislamiento de los nucleos seleccionados del resto de la imagen

fig.d.-Localización de los "pixels" con un determinado nivel de gris

-SCALIM reescala los valores de nivel de gris de la imagen para ajustarlos al rango dinámico del sistema.

-EDIT o fase interactiva.Durante esta fase se contornearon los nucleos de más de 100 células tumorales o epiteliales en caso de epitelio normal,elegidas al azar,lo cual pudo realizarse mediante el lapiz magnético sobre el tablero digitalizador.Posteriormente y mediante el empleo de una operación "feature extractor" se localizaron en la imagen los niveles de gris contenidos dentro del contorno dibujado.Usando tablas de realzamiento de imagen se asignó un falso color a cada nucleo en relación con su nivel de gris.Por último se eliminaron manualmente los restos de imagen indeseables(Lámina 7,Fig.b,c y d;Lámina 8,Fig.a,b,c).

Mediante un procedimiento similar se seleccionaron más de 30 linfocitos de cada preparación tanto en los casos normales como tumorales.

-RESET o limpieza de la memoria del procesador de datos

-definición de cada medida a realizar,en este caso el area,perímetro,diámetro máximo,diámetro mínimo,factor de forma y valor de transmisión tras promediación de todos los niveles de gris de cada nucleo.

-medida de todos los elementos definidos anteriormente(Lámina 8,Fig.d) ;y por último

-salida de datos a subunidades de memoria flexibles (discos).

LAMINA 8

FIG.a.-Fijación del gris nuclear localizado

FIG.b.-Asignación de un falso color mediante la aplicación de las "look-up tables"

FIG.c.-eliminación manual de los restos de imagen indeseables

FIG.d.-Medición del area,perimetro,factor de forma y valor de transmisión.Pérdida del falso color.

A simple vista en la imagen del videomonitor de imagen los nucleos celulares son facilmente distinguibles del gris de fondo,sin embargo,al delimitarlos con el lapiz magnético en el tablero digitalizador el contorno del gris nuclear no fue claramente distinto del gris de fondo,por lo que se optó por aislarlos del resto de la imagen de forma más rápida dibujando un círculo con un halo de gris perinuclear alrededor de cada nucleo(Lámina 7,Fig.b,c)

De esta forma cuando se intentan localizar los "pixels" con un determinado nivel de gris se observa como algunos "pixels" perinucleares tienen un nivel de gris incluido en el rango de los niveles de gris del nucleo,de manera que antes de poder localizar todos los "pixels" nucleares son muchos los "pixels" perinucleares no deseables añadidos que participan de la promediación y que han de eliminarse posteriormente(Lámina 7,Figd;Lámina 8, Fig.a).

Por último la eliminación de los restos de imagen indeseables ha de ser manual y muy cuidadosa si intentan valorarse parámetros como el area y el factor de forma.Quizás sea este el paso en el que se consume más tiempo ya que si se quiere ser riguroso han de emplearse varias veces las "look-up tables" del "hardware" auxiliar,única forma de estar seguros de la limpieza de la imagen antes de llevar a cabo las medidas seleccionadas(Lámina 8,Fig.a,b,c)

El "scalim" de los 256 niveles de gris posibles para cada "pixel" se llevó a cabo tomando como valor cero el valor medio del nivel de gris de una imagen en blanco de cada preparación.De esta forma los valores de nivel de gris de la imagen se ajustaron al rango dinámico del sistema.Puesto que la imagen en blanco se supone similar en todas las preparaciones no se estimó necesaria la aplicación de factores de corrección para hacer homologables los

resultados obtenidos de unas preparaciones a otras.

Con este método se efectuaron medidas del area,diámetro mayor,diámetro menor,factor de forma y valor de transmisión de 3.218 células tumorales y 842 células normales(Tabla2).

3-2-6.-Tratamiento estadistico.

Para el análisis estadistico se empleó el programa SPSS/PC.

El cálculo mediante regresión lineal múltiple para relacionar parámetros anatomopatológicos y morfofotométricos con la supervivencia se realizó por D. Emilio Sanchez Cantalejo profesor de bioestadística de la Escuela Andaluza de Salud Pública.

3-2-7.-Almacenamiento y tratamiento de los datos.

Los datos corespondientes a cada caso y a cada una de las células medidas se introdujeron en el ordenador almacenándose en un archivo del programa DBME PLUS.Mediante programas confeccionados "ad hoc" se trnasformaron los datos y se aplicaron factores de corrección.Posteriormente los datos ya elaborados se pasaron a un archivo para el tratamiento estadistico.Los datos obtenidos con el IBAS-IPS pasaron a conformar directamente un archivo en el paquete SPSS-PC.

4 RESULTADOS

4-1.-Generalidades.

Todos los individuos estudiados fueron varones de edades comprendidas entre 32 y 77 años (rango de 45 años) con una media de edad de 57 años (56.8 AÑOS).

Fueron predominantemente supragl6ticos 49 casos (65.33%),gl6ticos 24 (32%) y subgl6ticos 2 casos (2.66%).

Según la AJCC (1977) 10 casos fueron estadio II,(13.3%),40 (53.3%) estadio III y 29 (33.33% estadio IV .

En 27 casos se practicó laringectomia total simple,en 1 laringectomia parcial horizontal supraglótica más vaciamiento cervical funcional y en los 47 restantes laringectomia total más vaciamiento cervical funcional.En 45 de esos 47 casos con laringectomia total más vaciamiento,se realizó vaciamiento unilateral y bilateral en dos ocasiones.En un total,por tanto,de 48 casos de los 75 (64%) hubo vaciamiento cervical uni o bilateral.En la Tabla 3 aparecen listados todos los casos objeto de este estudio.

Sólo en un paciente se administró radioterapia preoperatoria.En 62 ocasiones se aconsejó radioterapia postoperatoria existiendo evidencia de su administración sólo en 23 individuos.

En tres pacientes se administró quimioterapia postoperatoria con cis-platino y 5-fluorouracilo.Uno de los pacientes a los que se administró quimioterapia ya habia recibido radioterapia postoperatoria anteriormente.

4-2.-Estudio histológico.

4-2-1.-Tumor primario.

En el examen microscópico de las preparaciones histológicas del tumor primario pudieron distinguirse células representativas de cada uno de los tres estratos:basal,intermedio y superficial,excepto en dos ocasiones en las que no fue posible debido a que el tumor presentó un solo tipo celular(Lámina 1,fig.d).

4-2-1-1.-Diferenciación.

De los 75 casos estudiados 14 (18.6%) se consideraron histológicamente bien diferenciados,34 (45.3%) moderadamente diferenciados y 27 (36.1%) pobremente diferenciados(Tabla 5).

4-2-1-2.-Queratinización.

De los 75 casos se consideró que la cantidad de queratina era abundante en 17 (22.66%),moderada o alguna en 23 (30.66%) y mínima o ausente en 30 (40%)(Tabla 4).

De los 14 casos bien diferenciados en 7 (50%) la queratinización estimada fue abundante,en 3 casos (24%) moderada y en 4 (26%) escasa.De los 34 casos moderadamente diferenciados en 9 (26%) la queratinización se consideró abundante,en 16 (48%) alguna y en 9 (26%) mínima o ausente.Por último de los 27 casos pobremente diferenciados en 17 (63%) la queratinización observada fue mínima o ausente,en 9 (32%) alguna y sólo en 1 (5%) abundante(Tabla 6).

4-2-1-3.-Infiltración linfoide.

Tabla 5.- Diferenciacion de los casos estudiados

Diferenciacion	Num. de casos
Buena	14 (18.6%)
Moderada	34 (45.3%)
Escasa	27 (36.1%)
TOTAL	75 (100%)

Tabla 6.- Diferenciacion/Queratinizacion

Diferenciacion	Queratinizacion		
	Buena	Moderada	Escasa
Buena	50%	24%	26%
Moderada	26%	48%	26%
Escasa	5%	32%	63%

Del total de 75 casos la infiltración linfoide se consideró marcada en 36 casos (48%),moderada en 21 (28%) y escasa o ninguna en 17 (22.66%).

De los 27 casos pobremente diferenciados la infiltración linfoide (IL) fue marcada en 14 (53%),moderada en 7 (26%) y escasa en 6 (21%).De los 34 moderadamente diferenciados la IL fue marcada en 15 (43%),moderada en 12 (35%) y escasa en 7 (22%) y de los 14 casos bien diferenciados marcada en 7 (50%),en 3 (24%) moderada y en 4 (26%) escasa(Tabla 7).

4-2-1-4.-Crecimiento tumoral.

El modo de crecimiento fue exofítico en 36 casos (48%) e infiltrante en 39 (52%) del total de 75,siendo infiltrante en el 63% (17 casos) de los 27 casos pobremente diferenciados,exofítico en el 57% (19 casos) de los 34 moderadamente diferenciados y también exofítico en el 50% (7 casos) de los 14 bien diferenciados(Tabla 8).

4-2-1-5.-Fibrosis.

Del total de 75 la fibrosis del estroma se consideró abundante en 55 (73.33%) moderada en 17 (22.66%) y escasa sólo en 3 (4%).La fibrosis reaccional fue abundante tanto en los tumores pobremente diferenciados (63%) como en los moderadamente diferenciados (83%) y bien diferenciados (71.4%),no existiendo ningún caso con fibrosis escasa dentro del grupo de tumores bien diferenciados(Tabla 9).

4-2-1-6.-Microinvasión vascular

Diferenciacion	Infiltracion Infolde		
	Marcada	Moderad.	Escasa
Buena	50%	24%	26%
Moderada	43%	35%	22%
Escasa	53%	26%	21%

Tabla 7.- Diferenciacion /I.L.

Tabla 8.-Diferenciacion/Crecimiento

Diferenciacion	Crecimiento tumoral	
	Exofitico	Infiltrante
Buena	50%	50%
Moderada	57%	43%
Escasa	37%	63%

Tabla 9.-Diferenciacion/Fibrosis

Diferenciacion	Fibrosis abundante
Buena	71.4%
Moderada	83 %
Escasa	63 %

La microinvasión vascular ha sido un parámetro muy difícil de definir ya que en la mayoria de las ocasiones es imposible distinguir,incluso a gran aumento,si las células tumorales insinuadas en la luz de los vasos sanguineos penetra realmente en ellos o sólo empujan hacia dentro el endotelio vascular.

No se observó invasión perineural alguna y sólo en un caso fue claramente visible un émbolo de tejido tumoral en un vaso linfático.

4-2-1-7.-Necrosis.

En la mayor parte de las preparaciones estudiadas se consideró escasa la cantidad de necrosis,tanto en los póbremente diferenciados (53%) como en los moderadamente diferenciados (65%) y bien diferenciados (50%).

4-2-1-8.-Actividad mitótica.

El número medio de mitosis por cada diez campos de gran aumento fue de 42.59 en los póbremente diferenciados con un valor mínimo de 6 y máximo de 134 siendo 60 el valor más frecuente.Para los moderadamente diferenciados el valor medio es 18.80 con máximos y mínimos de 49 y 2 respectivamente siendo 9 el valor más repetido.Por último para los póbremente diferenciados la media del número de mitosis fue 9.72 con valores que oscilan entre 0 y 23 siendo 12 el valor más frecuente(Tabla 10).

4-2-1-9.-Límites quirúrgicos.

En 8 casos de los 75 (10.66%) hubo evidencia anatomopatológica de infiltración tumoral de los límites quirúrgicos.

Tabla 10.-Diferenciacion/Mitosis

Diferenciacion	Mitosis x 10 c.g.a.
Buena	9.72
Moderada	18.80
Escasa	42.59

4-2-1-10.-Supervivencia.

De los 75 casos pudo observarse seguimiento en 61,en 52 casos durante 5 años o más y en 9 casos durante menos de 5 años.

La media de la supervivencia en meses para los póbremente diferenciados es de 36.1 (16 casos) y de 48.1 para el grupo formado por los moderadamente y bien diferenciados (36 casos).Diferencia que no resultó estadisticamente significativa (P=.066)(Tabla 11).

4-2-1-11.-Valor pronóstico de los datos anatomopatológicos.

Con objeto de comprobar en nuestra serie el posible valor pronóstico de la puntuación global obtenida con arreglo al conjunto de datos anatomopatológicos (variable "J"),se emplearon test de comparación de medias entre la variable J y supervivencia (SU),obteniendo los siguientes resultados:

-la media de la supervivencia en meses para un valor de J mayor o igual que 11 fue 38.31 y para J menor que 11 de 51.5 meses (sobre 29 y 23 casos respectivamente)(Grafica 1a).

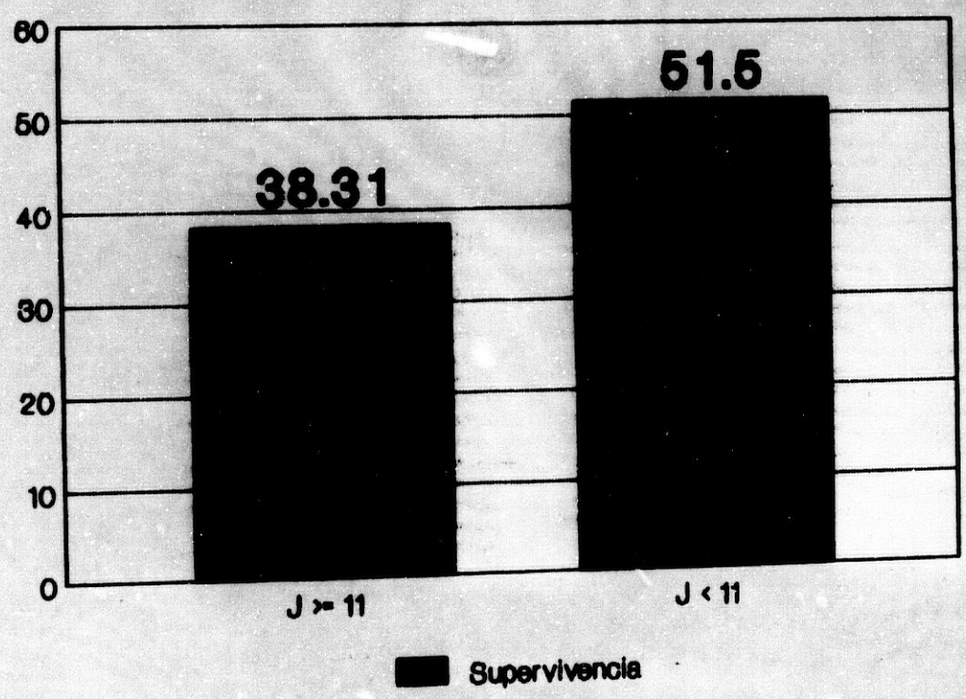
-la media del valor J para una supervivencia de 60 meses (5 años) fue de 9.58 (27 casos) y para una supervivencia menor de 60 meses de 12.61 (25 casos).Esta diferencia resultó estadisticamente significatica (P=.001)(Grafica 1b).

4-2-1-12.-Valor pronóstico de la actividad mitótica del tumor.

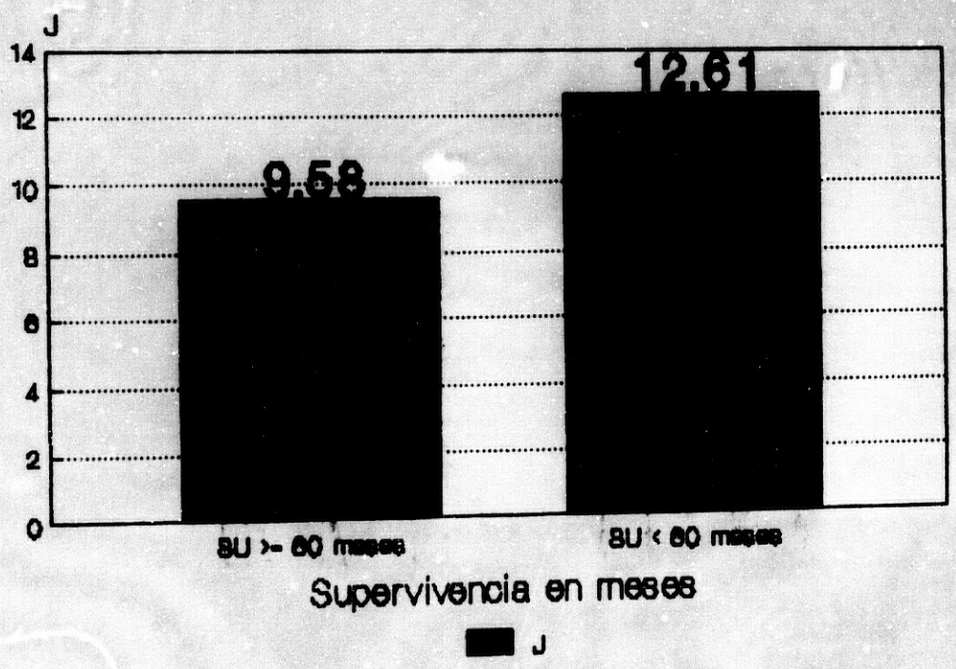
Tabla 11.-Diferenciacion/Supervivencia

Diferenciacion	Supervivencia (meses)
Buena y Moderada	48.1
Escasa	36.1

Grafica 1a.- Media de supervivencia en meses segun el valor J



Grafica 1b.- Media del valor J en relacion a la Supervivencia



p = .001

Puesto que en la variable J no está incluido el número de mitosis por cada diez campos (variable M),se comparan independientemente M y SU en meses.La media de la variable M para 27 casos con supervivencia mayor o igual de 60 meses fue de 17.9 y para 24 casos con SU menor de 60 de 28.1,no siendo la diferencia estadisticamente significativa (P>.05)(Grafica 2).

4-2-2.-Adenopatias cervicales.

De los 48 casos en los que se practicó vaciamiento se obtuvieron un total de 432 adenopatias de cada una de las cuales se realizó una sección histológica,es decir,no se hicieron cortes seriados.

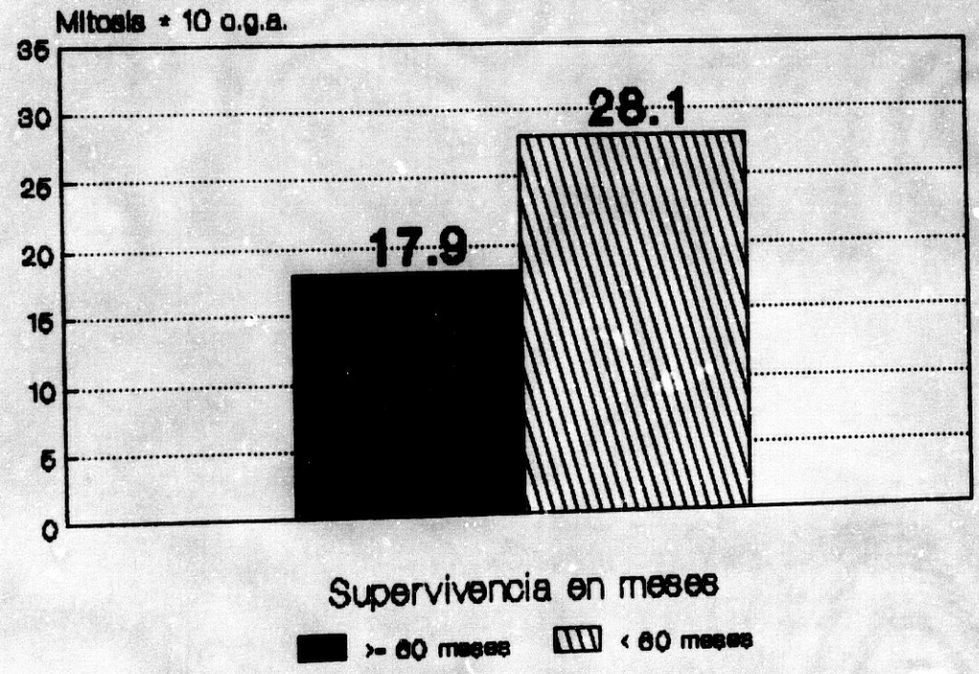
El número medio de adenopatias por individuo fue de 9,oscilando entre 1 y 38.De las 432 adenopatias 50 fueron metastásicas (11.57) y de ellas 14 (28%) presentaron evidencia histológica de extensión extracapsular.En ningún caso pudo observarse rotura de la cápsula por la masa tumoral por lo que se consideró que la extensión extracapsular era positiva cuando hubo tejido tumoral en la grasa peritumoral.

Las 50 metástasis tumorales se hallaron en 20 de los 48 casos referidos (41.66%).El número medio de matástasis ganglionares por caso fue de 2.5 oscilando entre 1 y 7.El tamaño medio de las mismas fue de 1.9 cm con límites comprendidos entre 0.7 y 3.5 cm.

4-2-2-1.-Tamaño de las adenopatias metastásicas y supervivencia.

La media de la supervivencia en

Grafica 2.-Numero de Mitosis por 10 c. en relacion con la Supervivencia



p >.05

meses para los casos con adenopatias metastásicas de 2 centímetros de diámetro o menos fue de 30.4 y de 27.6 meses para los pacientes con ganglios metaastásicos de más de 2 cm de diámetro.(sobre 7 y 5 casos respectivamente).

4-2-2-2.-Número de adenopatias metastásicas y supervivencia.

La media de la supervivencia en meses para los casos con dos o menos adenopatias metastásicas fue de 44 y de 15.2 para los casos con más de dos adenopatias metastásicas (sobre 9 y 5 casos respectivamente).

4-2-2-3.-Infiltración tumoral periganglionar y supervivencia.

El valor medio de la supervivencia en meses fue de 29 para los casos con extensión extracapsular comprobada y de 33 para aquellos sin evidencia de extensión extracapsular (sobre 4 y 8 casos respectivamente).

4-2-2-4.-Patrón histológico ganglionar.

De entre los cinco patrones histológicos considerados los ganglios con falta de respuesta fueron los más parecidos al ganglio linfático normal conservando bien visibles y prácticamente libres de contenido los senos marginales,intermedios y medulares.La corteza y la médula fueron facilmente distinguibles por una mayor apetencia tintorial de la primera atribuible a un menor número,diámetro y disposición de los senos linfáticos,de ellos los intermedios se continuan en la médula con os medulares,grandes,tortuosos e irregulares que se ramifican y anastomosan repetidamente fragmentando de esta forma el parénquima linfoide en numerosos cordones medulares.

En la corteza son evidentes los folículos primarios y secundarios con centro más claro,predominando en la médula el tejido linfático difuso.

En los ganglios con alguna reacción la distribución de los elementos descritos varia con arreglo al tipo histológico predominante.Así en la "histiocitosis sinusal" se observa un aumento del número y tamaño de los senos linfáticos tanto los marginales como los intermedios y medulares que adoptan una distribución irregular y dilatada con múltiples anastomosis entre unos y otros.El parénquima circundante suele estar constituido por tejido linfático difuso,denso,con algunos folículos de disposición marginal.La luz del seno se encuentra totalmente ocupada por células de citoplasma grande,eosinófilo mal delimitado y de superficie irregular que corresponde presumiblemente con células reticulares y/o macrófagos activos.

Cuando existe"predominio linfocitario" prácticamente todo el tejido ganglionar está constituido por tejido linfático difuso más o menos denso,con escasez de senos medulares permaneciendo conservados los marginales y algún intermedio.Las trabéculas fibrosas son escasas así como la presencia de folículos linfáticos,no existiendo diferencia alguna entre el parénquima cortical y el medular.

En la "depleción linfocitaria" el aspecto histológico es parecido al anterior,muy homogeneo,con pocos senos,con un tejido linfático difuso pobre y de escasa densidad lo cual constituye la diferencia fundamental con el tipo anterior.

Por último en la "hiperplasia de folículos germinales" el tejido ganglionar está

acupado en su mayor parte por folículos linfáticos de tamaño y densidad variables no limitados exclusivamente a la corteza sino que pueden hallarse también en la región medular constituyendo entonces los llamados folículos terciarios.En algunos de ellos se distingue a poco aumento la presencia de una región más clara en el centro rodeada en su porción superior de un casquete de linfocitos densamente distribuidos y una zona de transición más oscura en su porción inferior.En este último caso,por tanto,se trata de folículos germinales muy variables en número tamaño y distribución.

A pesar de la aparente diferencia existente entre unos patrones ganglionares y otros,en la práctica en gran número de casos es difícil decidir su inclusión en uno u otro tipo ya que sólo en raras ocasiones se cumplen todas y cada una de las características histológicas descritas para cada caso,siendo muy abundantes las formas intermedias o con datos sugestivos de los cinco patrones básicos dependiendo de la región examinada dentro de la misma adenopatia.

En nuestro estudio del total de 432 adenopatias a que anteriormente haciamos referencia,en 276 (63.8%) el patrón histológico predominante fue "histioctosis sinusal",en [illegible] (18.2%) "predominio linfocitario",en 23 (5.3%) "falta de respuesta","depleción linfocitaria" en 35 casos (8.1%) y por último "hipertrofia de folículos germinales" en 19 (4.4%).

Del total de 48 pacientes con vaciamiento ganglionar la "histiocitosis sinusal" fue el patrón histológico predominante en 38 (79.1%),el predominio linfocitario en 5 (10.4),la falta de respuesta en 3 (6.25%) y la depleción linfocitaria en 2 (4.1%).En ningún caso la hipertrofia de folículos

germinales fue predominante.

No se halló ninguna relación aparente entre patrón histológico ganglionar y grado de diferenciación del tumor primario.

Tampoco pudo establecerse de forma clara una relación entre patrón histológico ganglionar y supervivencia siendo la supervivencia media 43.9 meses para los de "histiocitosis sinusal"como patrón predominante (26 casos),36 meses para los de predominio linfocitario (2 casos) y 48 meses para los de "falta de respuesta" como patrón predominante (2 casos).

4-3.-Estudio morfofotométrico.

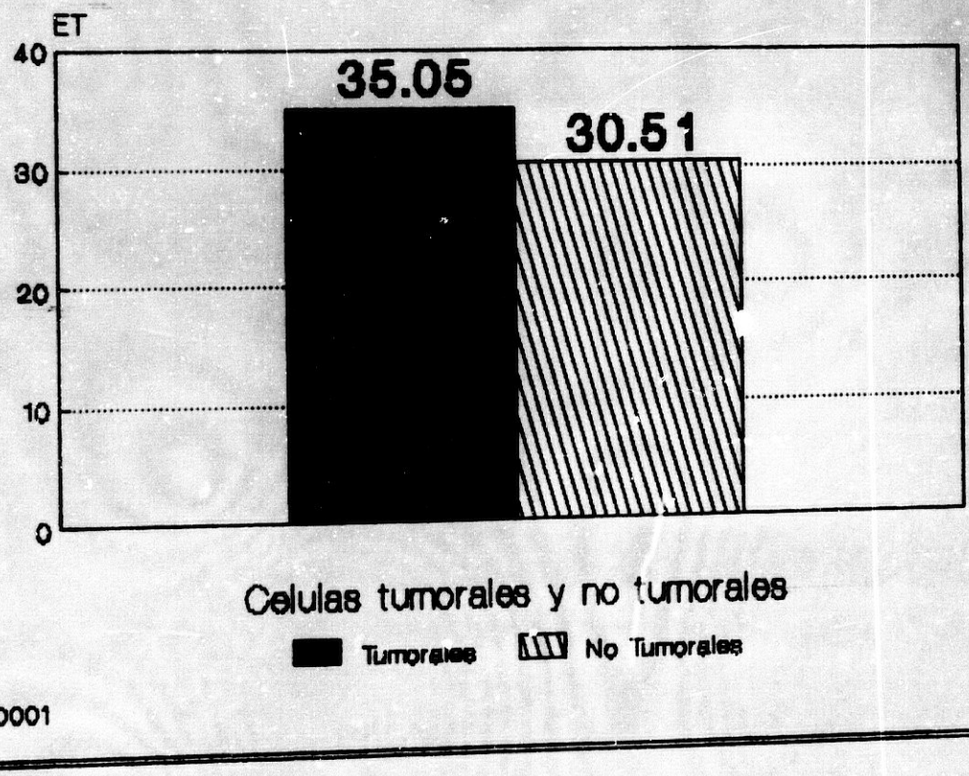
4-3-1.-ET.

El valor medio de la variable ET (producto del valor e extinción por el tamaño nuclear) en la población total,es decir,de las células epiteliales tumorales y no tumorales juntas fue de 34.65,con valores que oscilaron desde 4.29 hasta 121.19,lo cual representa un rango de 116.89 y un valor para la varianza 194.73.El valor más frecuente fue 28.47.

4-2-2.-ET de células tumorales y no tumorales.

Del total de 5.572 células epiteliales medidas 501 fueron células no tumorales,con valores medios de la variable ET de 35.05 para los tumorales y de 30.51 para los no tumorales.La media del valor ET y la varianza fueron significativamente distintas ($P<.0001$) al comparar la población de células tumorales con las no tumorales(Grafica 3).

Grafica 3.-Valor medio de ET para celulas tumorales y no tumorales



4-3-3.-ET de células basales intermedias y superficiales tumorales y no tumorales.

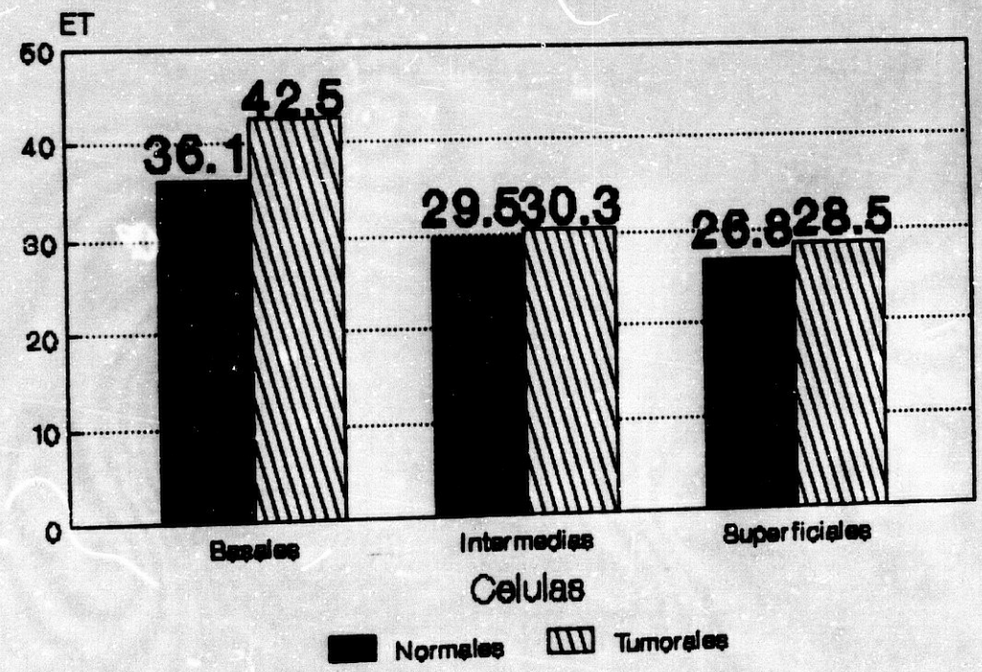
La media del valor ET de las células basales tumorales fue de 42.50 y la de las células basales no tumorales de 36.12 existiendo entre ambas una diferencia estadísticamente significativa (P<.0001)Entre la media del valor ET de las células intermedias tumorales (30.36) y no tumorales (29.58),así como entre la mediadel valor ET de las células superficiales tumorales (28.54) y no tumorales (26.85) no hubo diferencia estadísticamente significativa (P>.05)(Grafica 4).

En todos los casos se observó una tendencia descendente en cuanto al valor de ET se refiere desde las células basales a las superficiales tanto en los casos tumorales como en los no tumorales.

4-3-4.-ET y diferenciación.

Los 27 casos cuyo porcentaje estimado de células pobremente diferenciadas es superior al 50% están constituidos por un total de 1925 células epiteliales cuyo valor medio de ET es de 38.26 con una varianza de 221.440.De igual forma la media y la varianza de ET de las 2339 células epiteliales que constituyen los 34 casos de tumores con más del 50% de células moderadamente diferenciadas y de las 405 células que constituyen el grupo de 14 tumores con más del 50% de células bien diferenciads fueron 33.51 y 185.54; y 27.45 y 150.66 respectivamente,diferencia que resultó estadísticamente significativa (P<.0001)

Grafica 4.-Valor medio de ET
Celulas tumorales y no tumorales



Basales: $p < 0.05$

para ambos valores en todos los casos comparados dos a dos(Grafica 5).

Con objeto de facilitar la exposición denominamos variable "D" al grado de diferenciación.A dicha variable le atribuimos los valores D1,D2 y D3 siendo D1 aquellos casos (14) con más del 50% de células bien diferenciadas,D2 los que poseen más del 50% de células moderadamente diferenciadas (34 casos) y D3 los de más del 50% de células pobremente diferenciadas (27 casos).

Mediante el análisis de la varianza pudo comprobarse que el valor de ET es significativamente distinto para cada valor de D,existiendo además una estrecha correlación entre ET y cada uno de los valores de la variable D.

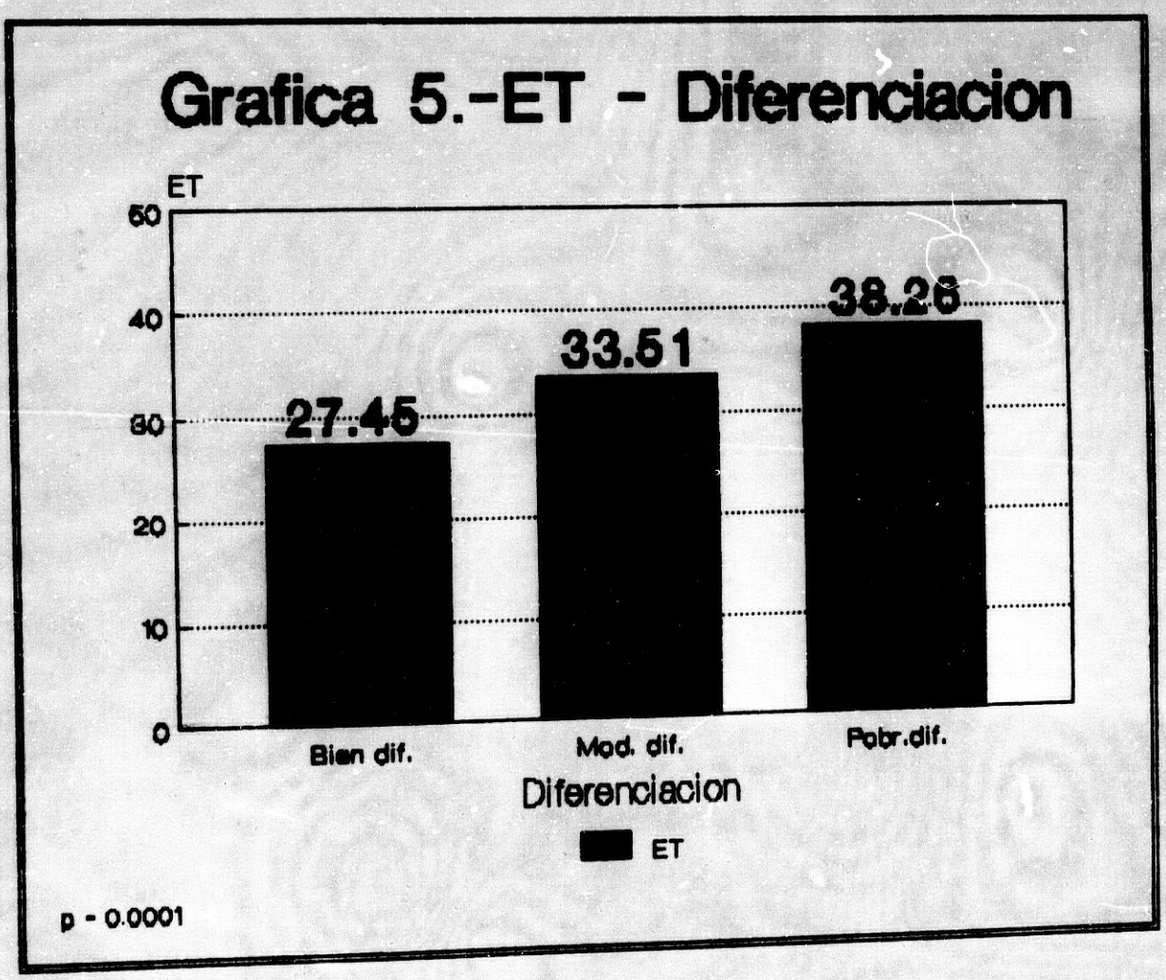
Mediante "múltiple range test" (Student,Neuman,Keuls) se comprueba una diferencia estadisticamente significativa al comparar los valores medios de ET para cada D entre si.

También mediante análisis de la varinza se concluye que el valorde la variable ET es significativamente distinto entre las células bsales intermedias y superficiales no tumorales y las bien, moderadamente y pobremente diferenciadas tumorales entre si(Grafica 4).

4-3-5.-ET y queratinización.

Dada la empírica relación establecida entre queratinización y diferenciación y con objeto de comprobar de alguna forma la veracidad de la misma se cmpararon las variables ET y Q(queratinización) con el siguiente resultado:

Grafica 5.-ET - Diferenciacion



-la media de ET cuando la queratinización es abundante es de 32.06 y de 34.69 y 38.54 cuando la queratinización es moderada y mínima o ausente.Esta diferenciación resultó estadístcamente significativa en todos los casos comparados dos a dos (P<.0001)(Grafica 6).

-mediante el análisis de la varianza pudo comprobarse una diferencia estadísticamente significativa de la media de ET para cada valor de Q.

-como consecuencia de lo anterior pudo establecerse correlación (P<.001) entre ET y la variable Q .

4-3-6.-ET y actividad mitótica.

De igual forma que en el caso anterior y por el mismo motivo se calculó la correlación existente entre las variable ET y M (número de mitosis por cada diez campos de gran aumento).

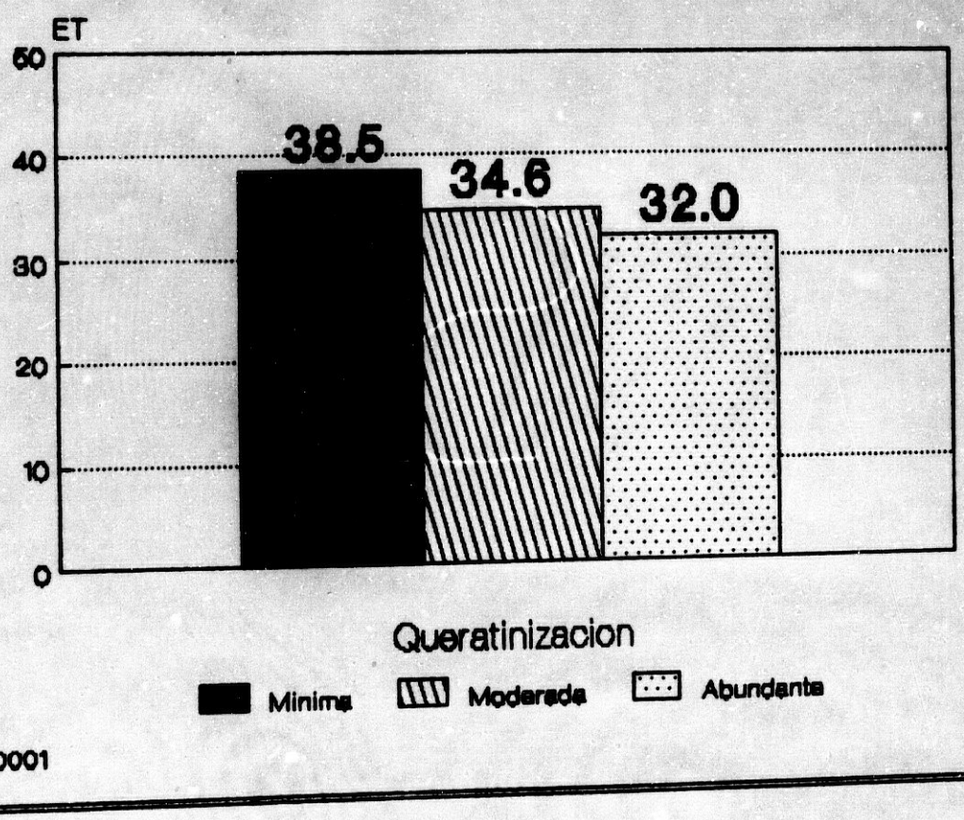
4-3-7.-ET y J.

Al comparar las variables ET y J como conjunto de variables anatomopatológicas excluida M,se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa (P<.004) entre la media de ET del grupo formado por 16 casos con J mayor o igual a 11 y el constituido por los 14 casos con J menor que 11 (40.5 y 31.8 respectivamente)(Grafica 7).

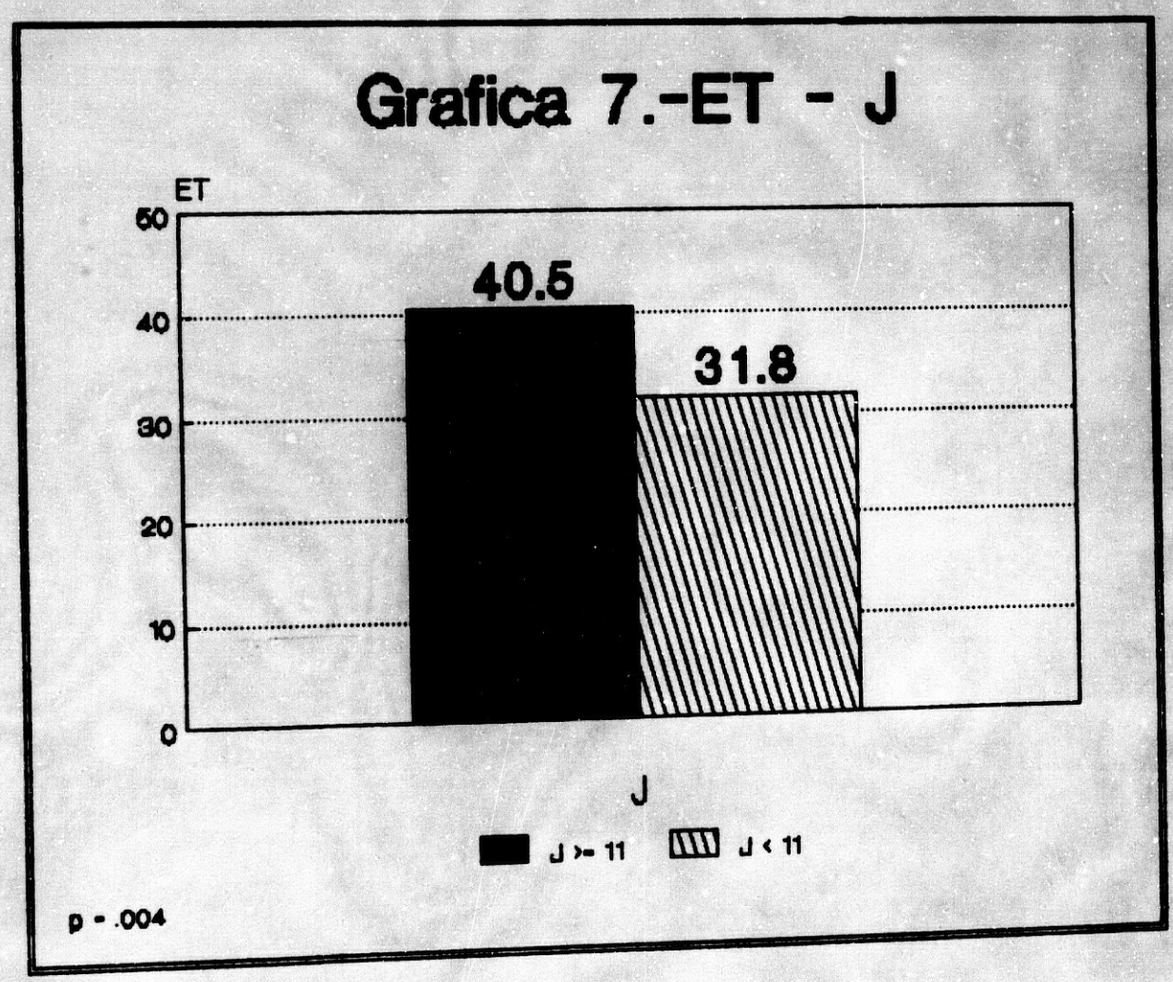
4-3-8.-ET y supervivencia.

Con objeto de estudiar el posible valor pronóstico de la variable ET como parámetro aislado

Grafica 6.-ET - Queratinizacion



Grafica 7.-ET - J



se la intentó relacionar con la supervivencia en meses de 34 casos con un periodo de seguimiento superior a 5 años y a los cuales se habia aplicado morfofotometria.

Tomando como valorde referencia la mediade la variable ET del total de células de los 34 casos (35.65) se comparó la media de la supervivencia en meses para un vaor de ET menor o igual a 35.65 y mayor que 35.65,no siendo la diferencia estadisticamente significativa (P>.05).

Tampoco hubo significación estadistica al comparar la media de la supervivencia de los casos con ET mayor o igual y menor respectivamente a 35.65 más y/o menos 8.66 (valor de la desviación standard).

Ya que la media del valor ET de las células basales tumorales es significativamente distinta a la media del valor ET de las células basales no tumorales se comparó el valor medio de la supervivencia para los casos en que el valor de ET de las células basales era mayor o igual y menor respectivamente que la media de ET de las células basales de los 34 casos tumorales en estudio más y menos respectivamente,una desviación standard.La diferencia de los valores de las medias comparadas no fue estadisticamente significativa (P>.05).

Tampoco hubo significación estadistica en cuanto a la supervivencia media de los dos grupos establecidos de forma similar al caso anterior usando como valores de referencia:

-la media del valor ET de las células bsales no tumorales más y menos una desviación standard.

-la media del valor ET del total de los casos con más del 50% de células pobremente diferenciadas y con más del 50% de células bien diferenciadas respectivamente (38.2 y 27.4 respectivamente).

La media del valor ET del total de células no fue significativamente distinta para los grupos de supervivencia mayor o igual y menor de 60 meses respectivamente (P>.05).De igual forma,la media del valor ET del total de células no fue significativamente distinta en el grupo de supervivencia menor o igual a 36 meses y mayor o igual a 60 meses.

Por último, la media del valor ET de las células basales tampoco fue significativamente distinta en los grupos de supervivencia mayor o igual y menor de 60 meses respectivamente.

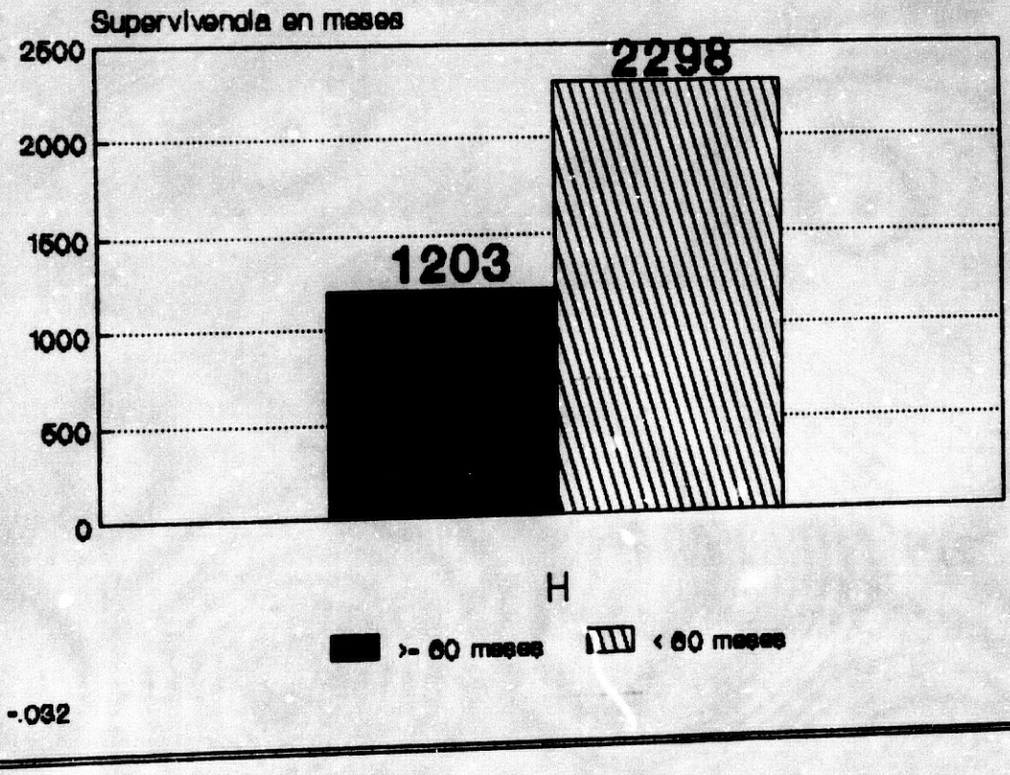
4-3-9.-ET y H,X,Y,Z.

La media del valor de la variable H es significativamente distinta (P=.018) en los grupos de supervivencia mayor o igual y menor de 60 meses respectivamente(Grafica 8),siendo H el resultado de multiplicar el valor de ET de cada una de las células basales por la variable J en cada caso y por el número de células basales en cada caso (c):

$$H=J*ETb*c$$

De la misma forma que en el caso anterior la media del valor de la variable X es significativamente distinto (P=.032) en los grupos de supervivencia mayor o igual y menor de 60 meses respectivamente,siendo X el resultado de multiplicar

Grafica 8.- Supervivencia en relacion con H



el valor de ET de las células basales por el número de células basales:

$$X=ETb*c=H/J$$

La media de la variable Y es significativamente distinta para el grupo de tumores con supervivencia mayor o igual y menor respectivamente de 60 meses,siendo Y el resultado de multiplicar el valor de ET de cada célula intermedia por el número de células intermedias en cada caso.En cambio no hubo significación procediendo de igual forma que en el caso anterior con la variable Z,siendo Z el resultado de multiplicar el valor de ET de cada célula superficial por el total de células superficiales en cada caso(Grafica 9)

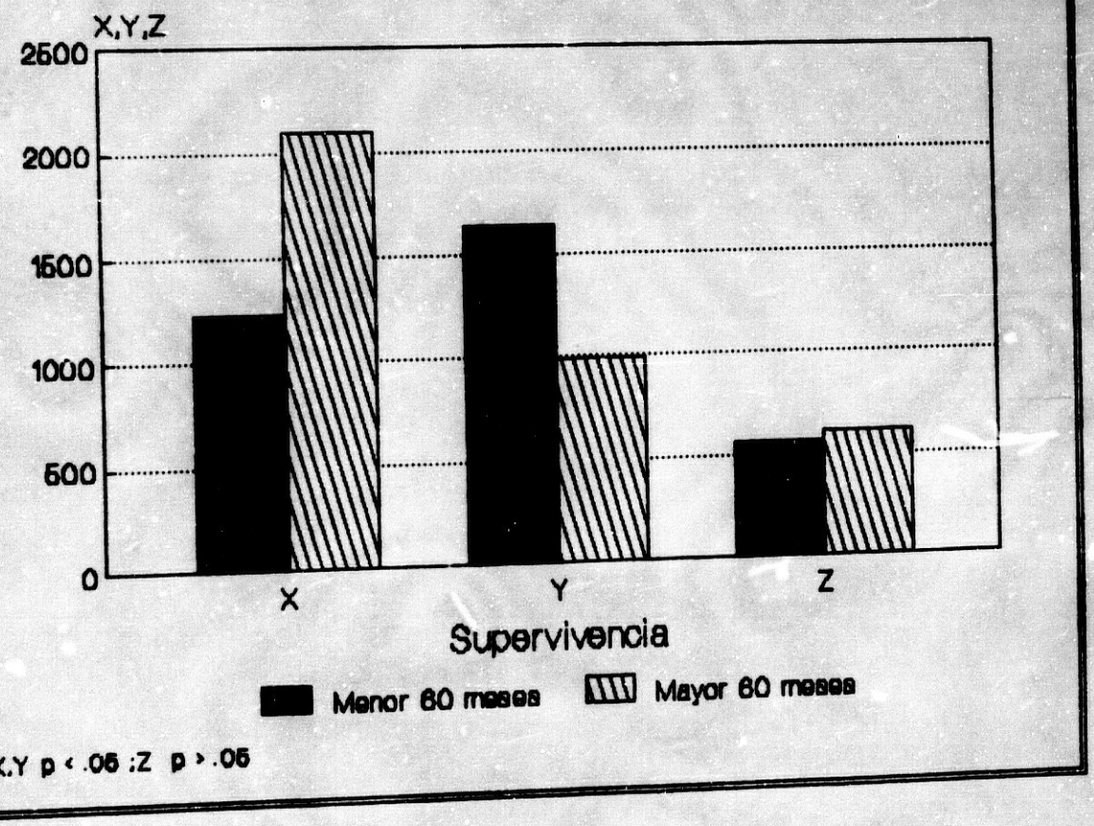
4-4.-Relación de los parámetros histológicos y morfofotométricos con la supervivencia.

Mediante regresión lineal múltiple se estudió la relación entre las distintas variables anatomopatológicas y morfofotométricas y la supervivencia tomada como variable dependiente.

Las variables consideradas fueron:

-porcentaje de células pobremente diferenciadas (PD).
-porcentaje de células moderadamente diferenciadas (MD).
-porcentaje de células bien diferenciadas (BD)
-queratinización (Q).
-infiltración linfoide (IL).
-número de mitosis por cada diez campos de gran aumento (M)
-fibrosis reaccional (F)

Grafica 9.-X,Y,Z y Supervivencia



-necrosis existente (N)
-modo de crecimiento ,exofítico e infiltrante (CR)
-el valor medio de ET para cada caso

El método de selección de variables empleado fue el "stepwile".

La variable más estrechamente relacionada con la supervivencia fue MD,es decir, el porcentaje de células moderadamente diferenciadas,con un coeficientede correlación de 0.53 (F=.0012).

Conocida la relación supervivencia/MD la segunda variable más estrechamente relacionada fue IL,es decir,la infiltración linfoide (F=.0004),siendo el coeficiente de correlación para ambas variables de 0.63.

Expuesto de forma ecuacional:

SU=29.63+0.51 MD-347 IL.

en donde SU=supervivencis,MD=porcentaje de células moderadamente diferenciadas,IL=medida de la infiltración linfoide.

De esta ecuación puede deducirse que la relación existente entre SU y MD es directa,e inversa la existente entre SU e infiltración linfoide.

4-5.-Grado de malignidad y supervivencia.

En un grupo de 28 casos se aplicó la fórmula de BÖKING (1985) para el cálculo del grado de malignidad:

GM=3*log(MI+1)/log(MIa-MIb)

siendo GM=grado de malignidad,MI=índice de malignidad,MIa=mayor valor de MI y MIb=menor valor de MI.El valor de MIa y MIb fue de 100287 y 97 respectivamente en nuestra serie.

Como se ha dicho en el apartado anterior:

MI=5CER*2CDI

5CER es el porcentaje de células definitivamente aneuploides,es decir claramente alejadas del valor euploide (2C).5CER es el porcentaje de células cuyo valor de ET es mayor o menor de 29.5 +/- 2*9.5,siendo 29.5 el valor medio de ET de las células intermedias normales y 9.5 su desviación standard.Se consideran,por tanto,células 2C a aquellas cuyo valor de ET está comprendido en 29.5+/-2*9.5.

El valor de GM osciló en nuetra serie entre un máximo de 3 y un mínimo de 1.1

La media de GM para los tumores pobremente diferenciados es de 2.53 y de 2.04 para los moderadamente y bien diferenciados.

La media de la supervivencia en meses para el grupo de casos con GM menor o igual a 2.34

fue de 58.8 y de 34 meses para el grupo de casos con GM mayor de 2.34,diferencia que resultó estadísticamente significativa (P=.04)(Grafica 10).

4-6.-Estudio mediante análisis de imagen.

Con objeto de comparar si las medidas del area,factor de forma y valor de transmisión son distintas entre las células tumorales y no tumorales se estableció un test de comparación de medias para cada una de esas variables.El resultado fue elsiguiente:

4-6-1.-Area nuclear de células tumorales y no tumorales.

El valor medio del area no fue significativamente distinto (P>.05) en las células tumorales y no tumorales(323.05 y 252.14)(Gráfica 11).

4-6-2.-Factor de forma de células tumorales y no tumorales.

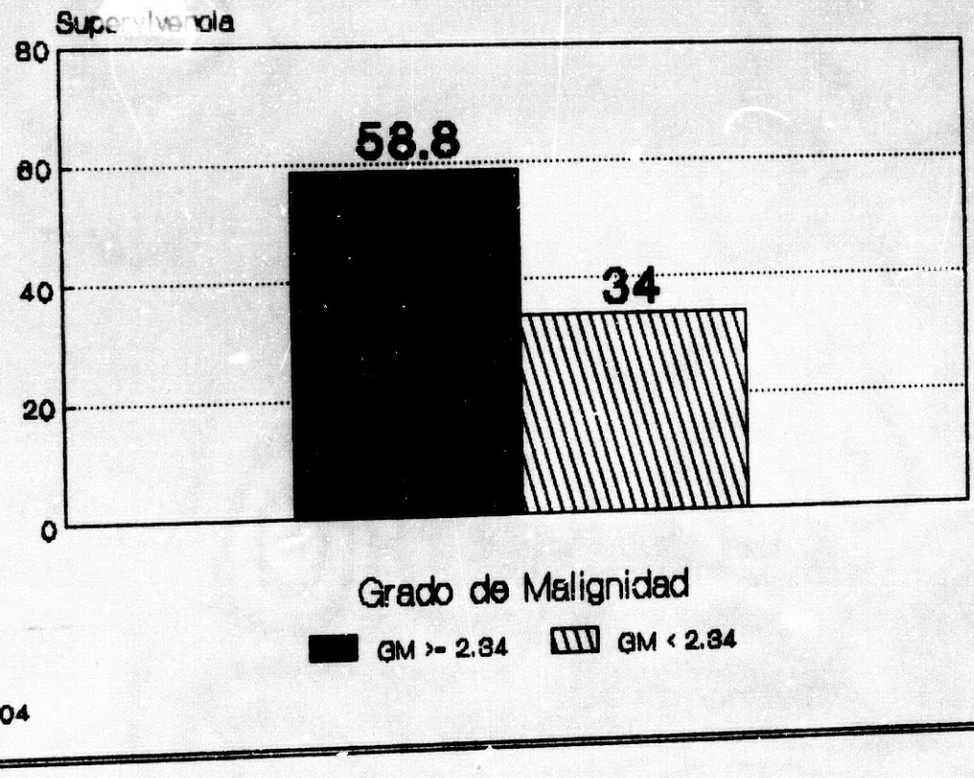
El valor medio del factor de forma no fue significativamente distinto (P>.05) entre las células tumorales (0.61) y no tumorales (0.62)(Gráfica 12).

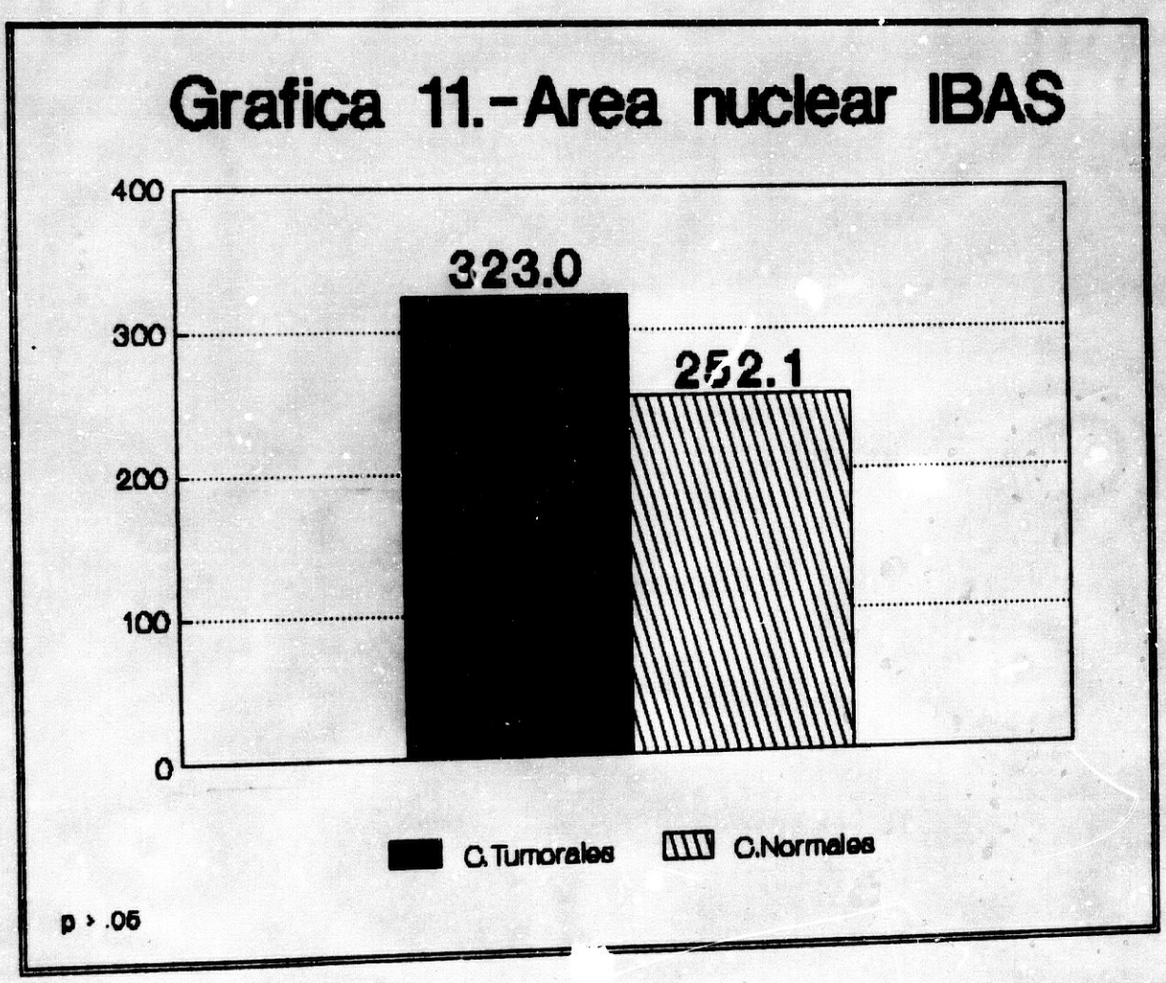
4-6.-Transmisión nuclear de células tumorales y no tumorales.

Tampoco la media del valor de transmisión de las células tumorales (25.70)fue significativamente distinta (P>.05) de la media del valor de transmisión en las células no tumorales (26.64)(Gráfica 13).

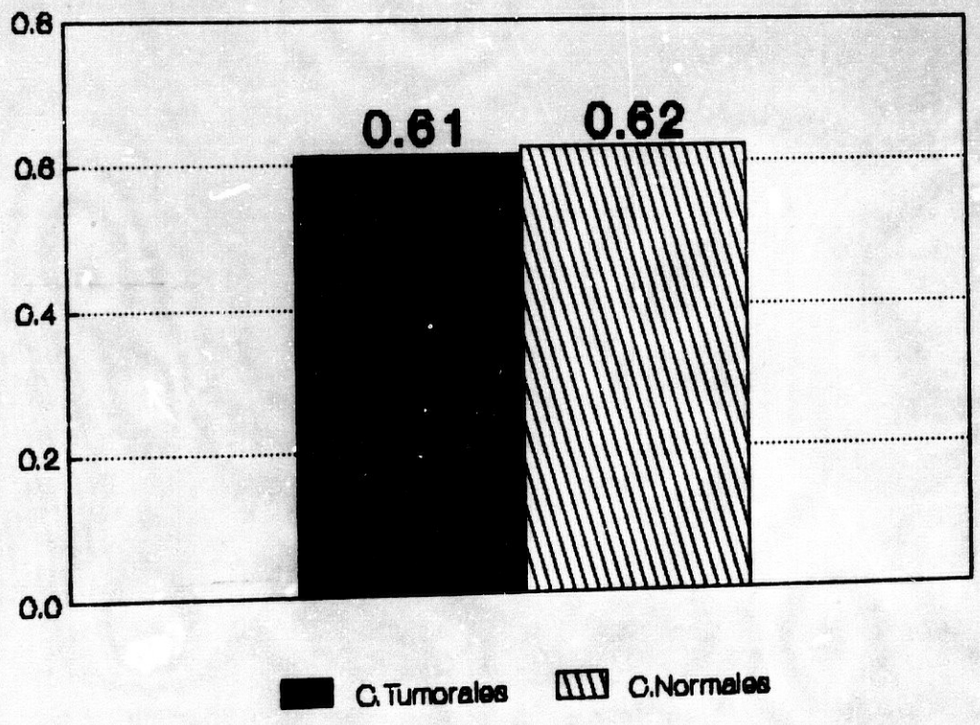
Sí se observó,como era de esperar,una

Grafica 10.-Grado de Malignidad y Supervivencia



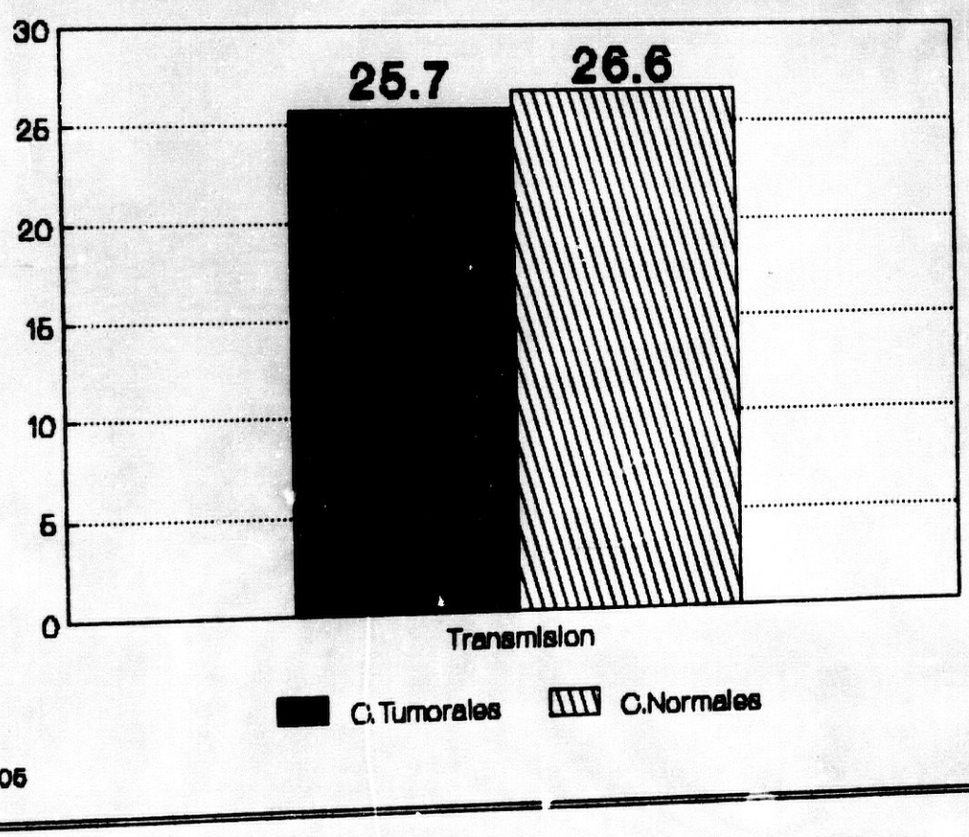

Grafica 11.-Area nuclear IBAS
400
300
200
100
0
323.0
252.1
C.Tumorales
C.Normales
p > .05

Grafica 12.- Factor forma. IBAS



$p > .05$

Grafica 13.-Densitometria/IBAS-IPS



p > .05

discreta tendencia en las células no tumorales a presentar menor area,un valor del factor de forma más cercano a la unidad y un valor de transmisión mayor que en las células tumorales.

4-7.-Correlación entre absorción nuclear mediante fotometria ytransmisión nuclear mediante densitometria.

Puesto que las técnicas de morfofotometria y morfodensitometria son esencialmente distintas los valores numéricos de sus resultados finales no pueden compararse en términos absolutos,en cambio si podria ponerse de manifiesto mediante un test de correlación,la posible relación existente entre los valores del producto del valor de extinción por el tamaño nuclear (ET),como principal variable morfofotométrica y los de transmisión (T) como principal variable morfodensitométrica.Como resultado final no pudo establecerse una correlación significativa (P>.05) entre las variables ET y T,o lo que es lo mismo,no pudo establecerse correlación alguna entre los resultados obtenidos con ambos métodos.

5 DISCUSION

5-1.-Parámetros clínicos.

Según los resultados expuestos anteriormente,puede concluirse que en nestra serie,el carcinoma epidermoide de laringe es más frecuente en varones de 57 años de edad promedio.La mayoria son supragl6ticos (63.33%),a diferencia de lo que ocurre entre los anglosajones (SILVER 1975) en los que predomina la localización glótica,o en la República General de Alemania (BECKER 1986) en donde el porcentaje de tumores supragl6ticos es muy inferior al de nuestro pais.Tradicionalmente se atribuye esta diferencia a las distintas étnias permaneciendo la verdadera causa aún desconocida.

La mayor parte de los tumores de nuestro grupo se encuentran en estadios avanzados principalmente III y IV (86.6%) como ocurre en la mayoria de las series publicadas (MC GAVRAN 1961,FERLITO 1976,SESSION 1976,FERLITO 1985,FERLITO 1986,BATSAKIS 1982),no existiendo ningún caso de estadio I,lo cual habla a favor de un diagnóstico tardio a pesar de que en un porcentaje apreciable (32%) la localización fue primariamente glótica por lo que supuestamente fue la disfonia ,siempre llamativa,el sintoma más precoz.

En todos los casos excepto en uno en que se administró radioterapia preoperatoria se prefirió como primer tratamiento,coincidiendo con la pauta generalmente aceptada (DE SANTO 1982,STRONG 1981,JESSE 1978,LINGEMAN 1977),la extirpación quirúrgica de la laringe con o sin vaciamiento seguida de radioterapia postoperatoria y sólo en dos ocasiones de quimioterapia.

5-2.-Estudio histológico.

Excepto en dos ocasiones en las que el

tipo celular predominante era muy variable y de disposición anárquica sin guardar semejanza alguna con cualquiera de los tres tipos celulares básicos del epitelio laringeo normal,en el resto fue posible distinguir por su apariencia microscópica células dispuestas en tres capas,guardando cierta semejanza con las células de los estratos basal,intermedio y superficial del epitelio no tumoral.Pensamos que al igual que ocurre en el epitelio normal la célula tumoral del estrato inferior o basal sufre un proceso de maduración progresiva al tiempo que asciende por el intermedio y superficial llegando como último paso a la queratinización de su citoplasma y a la formación de globos corneos.

Basándonos en esta observación llamamos tumores pobremente diferenciados a aquellos con más del 50% de células cuya apariencia microscópica recuerda a la del epitelio basal no tumoral procediendo de forma semejante para los moderadamente y bien diferenciados.Se trata,por tanto, de una modificación de la clasificación de BRODERS (1932) no empleada por ninguno de los autores consultados (BENNET 1971,JAKOBSSON 1973,FERLITO 1976,HOLM 1982).

En la práctica y en no pocas ocasiones,dependiendo de la región examinada microscópicamente dentro de la misma preparación,pueden observarse zonas que corresponderían a epitelios más o menos madurativos,por lo que creemos absolutamente necesario el estudio detenido de todos los campos microscópicos de varias preparaciones antes de tomar la determinación final de incluirlo en uno u otro grupo de la clasificación expuesta.

Teóricamente el pronóstico es mejor en los tumores bien diferenciados y peor en los

pobremente diferenciados (BENNET 1971,JAKOBSSON 1873,FERLITO 1976).En nuestra serie,sin embargo,no existe diferencia estadisticamente significativa en cuanto a la supervivencia de pacientes con tumores pobremente diferenciados y el grupo formado por los moderadamente y bien diferenciados,aunque si se observó tendencia a una menor supervivencia en el primer grupo (KILLANDER 1976).

Hemos considerado la presencia de queratina puesta de manifiesto por los tipicos globos corneos,como un estadio final en el proceso de maduración y no como signo inequivoco del tipo celular bien diferenciado,es decir, puede haber queratina en un epitelio tumoral que siga su proceso de maduración aún siendo las células pobremente diferenciadas las más abundantes (JAKOBSSON 1972,JAKOBSSON 1973,ENEROTH 1973,WILLEN 1975).A pesar de esta distinción en la mayoria de los tumores bien diferenciados la cantidad de queratina fue abundante,en los moderadamente diferenciados moderada y en los pobremente diferenciados escasa.Por todo ello puede concluirse que la presencia de gran cantidad de globos corneos es signo de buena maduración y en la mayor parte de los casos además de buena diferenciación,como tradicionalmente se viene admitiendo (BENNET 1971,FERLITO 1976,JAKOBSSON 1973).

Desde el nacimiento de la toria de la inmunovigilancia como mecanismo de defensa antitumor son muchos los investigadores que han dirigido su atención al infiltrado linfocitario peritumoral en un intento de encontrar en él soluciones a los problemas planteados por el estudio aislado de la histologia del tumor primario.

El papel jugado por estas células permanece oscuro y es interpretado de muy diversas formas según los distintos autores.Para unos,los que

consideran de más importancia pronóstica la histologia del tumor primario (KRAUS 1976,MALICKA 1971),la respuesta peritumoral no es más que un reflejo de la mayor o menor agresividad de la neoplasia.Un infiltrado abundante seria indicativo de un violento intento de rechazo de una tumoración histológicamente muy agresiva.Para otros,los que consideran de mayor valor pronóstico el estado inmunitario del huesped (GATTI 1971HAMLIN 1986,KIELY 1972) un infiltrado peritumoral abundante seria indicador de una buena respuesta defensiva y por tanto,de mayor posibilidad de control de la neoplasia.

Para algunos un infiltrado abundante en ls inmediaciones del tumor es siempre signo de buen pronóstico (JAKOBSSON 1973,HOLM 1982),para otros sólo es signo de buen pronóstico en tumores moderadamente diferenciados o bien diferenciados (BENNET 1971,FERLITO 1976).Para ZEROMSKI (1986) en cambio,no hay relación alguna entre el infiltrado y el grado de diferenciación del tumor primario.

La infiltración linfoide peritumoral como elemento pronóstico puede relacionarse con otros datos anatomopatológicos como la presencia de adenopatias metastásicas;BENNET (1971) considera que un infiltrado peritumoral abundante es favorable en pacientes con alguna adenopatia metastásica,no encontrando relación con los que no presentan metástasis.

En nuestro estudio,en la mayor parte de los tumores bien,moderadamente y pobremente diferenciados el infiltrado peritumoral se consideró abundante,por lo que en principio podria afirmarse que éste no depende exclusivamente del grado de diferenciación del tumor primario sino que deben considerarse otros factores tales como la capacidad

defensiva del huesped,el estado nutricional del paciente en el momento de la intervención,o el grado de toxicidad alcohólica del individuo,entre otros.

Gracias a la aplicación de los anticuerpos monoclonales en inmunopatologia es posible conocer las distintas subclases de linfocitos y la identificación de las demás células implicadas en el mecanismo de defensa antitumor.

El empleo de estas técnicas en preparaciones de carcinoma epidermoide de laringe ha hecho posible la determinación del tipo o tipos celulares que constituyen el infiltrado peritumoral,estudiado por nosotros y la mayoria de los qutores (FERLITO 1987,FERLITO 1976,HOLM 1982)sólo con microscopia óptica convencional.

Desde los estudios de RABIN (1983) sabemos que los linfocitos peritumorales estan constituidos fundamentalmente por T-"helper",T-supresores y células plasmáticas,productoras principalmente de Ig G (DALIELSON 1983).Los linfocitos T se situan tanto en la periferia como en el interior de la masa tumoral,este último grupo de linfocitos peritumorales sólo puede ponerse de manifiesto mediante técnicas inmunohistoquímicas y no por la observación de secciones de tejido teñidas con métodos tradicionales.Las células plasmáticas y "Natural Killer" sólo se encuentran alrededor del tumor y en menor proporción que los linfocitos T (HARABUSCHI 1985).Del grupo de linfocitos T,los T-supresores se encuentran tanto en la periferia como en el interior de la masa tumoral,mientras que los T-"helper" son claramente más abundantes en la periferia del tumor.

Al principio el infiltrado celular es

más abundante en la periferia que en el interior de la masa tumoral,posteriormente el número de células intratumorales aumenta a expensas de los T-"helper",T-supresores y monocitos,permaneciendo los T-supresores en número apreciable en la periferia al tiempo que disminuyen en ella los T-"helper" y monocitos (ZEROMSKI 1986).

A pesar de estos hallazgos es poco lo que se conoce sobre el papel desempeñado por cada uno de estos subtipos celulares referidos,tanto en las inmediaciones como en el interior de la masa tumoral ya que es también escaso nuestro conocimiento actual acerca de la fisiologia de estas células en el marco de la inmunidad general (SVENNEVIG 1979,SHIMOKAWARA 1982).En cualquier caso si parece claro que la observación del infiltrado linfocitario en preparaciones histológicas teñidas con coloranteas habituales no es más que un aspecto parcial de la auténtica relación huesped-tumor en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello (HARABUCHI 1985,HOLGATE 1986,ENGLEMAN 1981),permaneciendo por completo descococido el mecanismo íntimo de defensa antitumoral que comienza ahora a vislumbrarse gracias al creciente desarrollo de la inmunologia como ciencia básica (HIRATSUKA 1984,HUSBY 1976,LEDBETTER 1981,POPPEMA 1981).

En cuanto al tipo de crecimiento este fue exofitico en la mayoria de los casos con moderada y buena diferenciación y predominantemente infiltrante en los póbremente diferenciados,lo cual no hace más que corroborar los hallazgos de múltiples investigadores (BATSAKIS 1974,CLERF 1980,DALBY 1976, DE SANTO 1976).

La fibrosis reaccional,sin embargo se consideró abundante independientemente del grado de diferenciación.En las preparaciones con fibrosis

abundante el infiltrado peritumoral observado fue escaso actuando aquella como enmascarador de este parámetro.

El hallazgo de microinvasión vascular en vasos sanguineos y linfáticos,así como la invasión perineural ha sido poco frecuente y de dudosa interpretación en nuestra serie por lo que no se han obtenido resultados reproducibles que puedan usarse como referencia.En nuestra opinión la presencia de émbolos vasculares debe valorarse con cautela dada la dificultad en la observación clara de los mismos incluso a gran aumento en contra de la opinión de BATSAKIS (1984,1985),CLOSE (1987) y RICHARD (1987).

La cantidad de necrosis celular se consideró escasa,indepedientemente del grado de diferenciación a diferencia de lo que cabria esperar,ya que en principio esta necrosis podria interpretarse como indice de un crecimiento tumoral rápido,propio de tumores de escasa maduración,teoria que no se ha visto confirmada en nuestro caso.

Con objeto de comparar el valor pronóstico global de algunos de los hallazgos púramente anatomopatológicos tales como grado de diferenciación,queratinización,infiltración linfoide,modo de crecimiento,presencia de fibrosis y microinvasión vascular se obtuvo la puntuación total para cada caso,resultante de la de la suma aritmética del valor asignado a cada una de las variables enunciadas.No se tuvo en cuenta el pleomorfismo nuclear como parámetro puntuable por considerarlo dificil de determinar a diferencia de lo expuesto en otras clasificaciones precedentes (JAKOBSSON 1973,HOLM 1982).

Al igual que en el proceder de

JAKOBSSON (1973) se valoraron independientemente grado de diferenciación y queratinización,en cambio HOLM (1982) se basa en la cantidad de queratina observada para definir el grado de diferenciación.Mientras que JAKOBSSON (1973) emplea la clasificación de BRODERS (1932) para el grado de diferenciación nosotros emplamos un método que,en cierto modo,puede considerarse una varioación de la de BRODERS (1932) basada en el predominio de células con aspecto histológico similar a las del estrato basal en los pobremente diferenciados,intermedio en los moderadamente diferenciados y superficial en los bien diferenciados.

A la puntuación total obtenida se la denomina variable J,comprobándose una supervivencia menor para valores de J mayores de 11 y mayor para J menor que 11,lo cual confirma el interés pronóstico de J como valor anatomopatológico global,en concordancia con los resultados de otros investigadores (ENEROTH 1973,JAKOBSSON 1972,JAKOBSSON 1973,WILLEN 1975,HOLM 1982).

En nustro estudio no se incluyó el número de mitosis por cada diez campos (M)dentro del valor J comprobándose un número mayor de mitosis conforme la diferenciación del primario fue más escasa,en cambio,no pudo atribuirse a M valor pronóstico como parámetro aislado.

El estudio de la inmunidad regional en el carcinoma epidermoide de laringe ha despertado un gran interés al considerarse la presencia de adenopatias cervicales como signo de extensión tumoral fuera de los límites del órgano en el que se originó.Por ello son muchos los investigadores que mediante el estudio anatomopatológico de los ganglios linfáticos pretenden obtener parámetros que aisladamente o junto con otros referentes al tumor

primario pueden resultar útiles en una valoración pronóstica del paciente.En la mayor parte de los casos (RICHARD 1986,JAKOBSSON 1985,CARTER 1985,SNYDERMAN 1983,GRANDI 1985,LEIPZIG 1982,SCHULLER 1980) se evaluan la presencia de metástasis ganglionares,la extensión extracapsular de dichas metástasis y el patrón histológico de los ganglios metastásicos o no (BERLINGER 1975,OPHIR 1985,DEMARD 1987,AUDOIN 1986).Los resultados son extraordinarimente variables y así mientras que para GRANDI (1985) existe tendencia a una menor supervivencia conforme aumenta elnúmero de metástasis ganglionares,para RICHARD (1986) no hay tal relación.

En nuestra serie se ha observado mejor pronóstico en pacientes con menos de dos adenopatias metastásicas,no comprobándose diferencia estadística por el escaso número de ganglios metastásicos evaluados.

En cuanto al tamaño coincidimos con GRANDI (1985) en que existe una tendencia no estadísticamente demostrable a una supervivencia menor en pacientes con adenopatias metastásicas de más de dos centímetros de diámetro.

Para nosotros no hay relación aparente entre extensión extracapsular y supervivencia en contra de la opinión de SNYDERMAN (1983),MORRA (1987),RICHARD (1986) Y JOHNSON (1985).Para autores como GRANDI (1985) y RICHARD (1986) tampoco hay relación alguna entre extensión extracapsular y recidiva local,por el contrario CARTER (1985) Y JOHNSON (1985) encuentran una alta proporción de recidivas locales en el músculo y adventicia yugular conforme aumenta la frecuencia de extensión extracapsular.

Desde que BLACK (1956) iniciara el estudio de la citoarquitectura de los ganglios linfáticos en pacientes con carcinoma de mama,han sido varios los grupos de investigadores que han intentado aplicar criterios similares en tumores de otra localización.MALICKA (1971) es la primera en utilizar la clasificación citoarquitectural de BLACK (1956) en pacientes con carcinoma epidermoide de laringe llegando a la conclusión de que el predominio de adenopatias con histiocitosis sinusal es signo de buen pronóstico.BERLINGER (1976) y RING (1985)en cambio,asocian una buena evolución del paciente con el predominio de foliculos germinales ya que no incluyen la histiocitosis sinusal como patrón a tener en cuenta.

Para nosotros el patrón histológico ganglionar no está relacionado con la supervivencia o al menos es de menor valor que otros datos anatomopatológicos de evaluación más rápida y sencilla.

Según nuestra experiencia no siempre es fácil incluir las adenopatias observadas al microscopio en alguno de los grupos tan rígidamente establecidos.Por otro parte,los criterios de clasificación pueden ser muy variables dependiendo de las características que quieran valorarse en cada caso.Para DEMARD (1987) por ejemplo,los patrones histológicos son totalmente distintos a los empleados en los estudios iniciales de BLACK (1956) o TSAKRKLIDES (1973),ya que este autor pretende dilucidar si la respuesta es esencialmente celular o humoral atendiendo al predominio de los linfocitos paracorticales,que son principalmente linfocitos T o al número aumentado de foliculos germinales constituidos en su mayoria por linfocitos B.

En ningún caso de los estudiados por

nosotros pudo observarse reacción granulomatosa ganglionar por lo que a diferencia de OPHIR (1986) no pudimos incluirlo como el sexto patrón histológico de nuestra clasificación.

5-3.-Estudio morfofotométrico.

La segunda parte del presente trabajo consiste en la aplicación de técnicas tales como la morfofotometria y el análisis de imagen con objeto de comparar sus resultados con los obtenidos a partir del estudio histológico tradicional en la valoración de preparaciones teñidas con técnicas de rutina.De esta forma pretendemos sumarnos al cada vez más numeroso grupo de investigadores que intentan hacer de la patologia cuantitativa una técnica habitual en el diagnóstico anatomopatológico (MARCHEWSKY 1986,BERLINGER 1987,FALLON 1979,SHAPIRO 1985,CULPIN 1982,DIXON 1976,CRISSMAN 1980,HARTMAN 1986,BARLOGIE 1983,GROVE 1979,DELGADO 1984,MIGNOT 1981,BARRES 1985,KALTER 1985,HELLQUIST 1980,GRÖNTOFT 1977 BÖKING 1985).

Tanto la morfofotometria como el análisisde imagen se basan en el estudio de la forma,tamaño y densidad de los nucleos celulares teñidos o no con técnicas especificas.Las células con nucleos más grandes y de mayor densidad son las de mayor contenido en heterocromatina,es decir,DNA no "funcional",con actividad exclusivamente reproductiva,por lo que se supone que poseen una mayor capacidad proliferativa.Serian las células en las fases S y G2 (BARLOGIE 1982,SCHACNEY 1979).

En fotometria se denomina valor de extinción a la cantidad de luz absorvida por un objeto problema,en nuestro caso nucleos celulares;conociendo la intensidad del foco luminoso y la luz que llega al fotosensor o luz transmitida

puede conocerse indirectamente el valor de extinción (PILLER 1977).Si empleamos tinciones especificas (FEULGEN 1924 cit. BÖKING 1985) el valor de extinción seria una medida relacionada directamente con el contenido en DNA del nucleo pero no la cantidad de DNA nuclear.En nuestro caso al emplear la fotometria en preparaciones de archivo teñidas con hematoxilina eosina (JAKOWSKI 1971, ZAJICECK 1972,ESQUIVIAS 1986,ESQUIVIAS 1987) el valor de extición no es más que una medida de la cantidad de hematoxilina fijada por el nucleo,un valor muy indirectamente relacionado con el DNA si tenemos en cuenta que éste representa alrededor del 9% del material nuclear total (GANTER 1969,BARGMAN 1968).Los nucleos con un valor de extinción muy alto corresponderian teóricamente a células con una mayor capacidad proliferativa.

Hemos de tener en cuenta que para un mismo contenido el valor de extinción será más alto en aquellos nucleos de menor tamaño ya que en ellos la hematoxilina fijada se dispone más densamente,haciedo menor la cantidad de luz transmitida (ESQUIVIAS 1986,ESQUIVIAS 1987).Con objeto de obviar este error y basándonos en experiencias previas (ESQUIVIAS 1987)hemos relacionado en nuestro trabajo el valor de exctinción y el tamaño nuclear,una medida lineal en relación con los diámetros mayor y menor del nucleo;ambas variables se incluyen en ET que resulta de multiplicar el valor de extinción por el tamaño nuclear.

En la práctica la selección de los nucleos a los que puede aplicarse esta técnica no es tarea fácil debido fundamentalmente a que la cromatina no se dispone de forma homogenea sino en acúmulos irregularmente distribuidos,sobre todo en su porción periférica inmediatamente por dentro de la membrana nuclear.

Ya que se trta de una técnica empleada por primera vez en el estudio de preparaciones de archivo de carcinoma epidermoide de laringe se expondrán de una forma descriptiva la relación de ET con el resto de las variables anatomopatológicas obtenidas en cada caso.

Como primera medida se demostró que ET es significativamente distinto en los casos tumorales comparados con los no tumorales.Es de gran importancia resaltar que esa diferencia se debe fundamentalmente a las células del estrato basal.El hecho de que la media de ET sea significativamente distinta sólo entre las células basales,tumorales y no tumorales y no ocurra lo mismo con las intermedias y superficiales sugiere que la mayor actividad proliferativa se situa a nivel de las células de disposición más inferior,mientras que las intermedias y superficiales son muy similares morfofotométricamente hablando a las células intermedias y superficiales de epitelios normales,es decir,en el carcinoma epidermoide de laringe las células que más diferencia muestran con su contrapartida benigna son las de los estratos basales.Parece,por tanto,que al igual que ocurre en el epitelio normal la célula basal tumoral sigue un proceso de maduración progresiva,de manera que esa actividad proliferativa prácticamente se pierde al llegar a los estratos intermedio y superficial.Se comprueba de esta forma objetivamente lo que ya habiamos observado en el estudio microscópico acerca de la similitud histológica entre las células de los estratos intermedios y superficiales tumorales y no tumorales.

La media de ET y la variabilidad de los valores individuales es significativamente mayor en los tumores pobremente diferenciados que en los moderadamente y bien diferenciados,que es lo mismo que afirmar que los nucleos de las células de escasa

diferenciaación son de mayor tamaño y de contenido más denso con mayor rango de valores para una y otra característica.

En el presente trabajo se ha demostrado una estrecha relación (estadísticamente significativa) entre ET y diferenciación (D);valores altos de ET son expresión de escasa diferenciación,indicando el mayor rango un pleomorfismo mayor.La media del valor ET es distinta para cada valor de Q (queratinización).También es clara la correlación entre ET y M (mitosis).Dado que la queratinización y el número de mitosis por cada diez campos está en relación con el grado de diferenciación,se explica que al haber correlación entre ET y D también la haya entre ET y los parámetros Q y M.

La queratinización es mayor en los tumores bien diferenciados con un valor de ET menor y el número de mitosis es mayor en tumores muy proliferantes,escasamente diferenciados con valores de ET altos y muy variables,lo cual implica nucleos celulares de mayor contenido,de mayor tamaño y con una variabilidad mayor,al contrario de lo que ocurre en la población celular normal en donde no hay tanta dispersión de los valores de ET,expresión de mayor homogeneidad de los nucleos.

A pesar de múltiples intentos no pudo establecerse relación directa entre ET y supervivencia.Si hay relación,en cambio,entre supervivencia y la variable H,en donde además de ET participan J y C,siendo C el número total de células medidas que seria constante para todos los casos ya que se han medido 100 células epiteliales en cada uno de ellos.Puesto que en H participa J,una variable que sí está relacionada con la supervivencia (SU), podria pensarse que la relación SU/H se debe

fundamentalmente al valor de J.

En las variables X,Y y Z sólo participan ET y el número de células basles,intermedias y superficiales respectivamente.X e Y sí están relacionados con SU en cambio Z no,indicando de esta forma que el valor ET y el número de células de los estratos basal e intermedio sí podrian tener algún valor pronóstico pero no el valor de ET y el número de células del estrato superficial.La explicación quizás sea que la célula bien diferenciada tumoral es muy similar a la superficial normal tanto morfométricamente como fotométricamente,de forma que su valor ET no es lo suficientemente distinto al de las células superficiales de un epitelio normal.

5-4.-Parámetros discriminantes en relación con la supervivencia.

Para nosotros la ecuación:

$$S=29.63+0.51\ MD-347\ IL$$

obtenida mediante regresión lineal múltiple (DRAFOR 1981) es de gran interés puesto que no existe ninguna referencia similar en la literatura consultada,tratándose ,por tanto,de una aportación original.Mediante esta ecuación se comprueba que el porcentaje de células moderadamente diferenciadas es la variable que más relación tiene con la supervivencia.Dado que el valor ET de las células tumorales de los estratos más bajos es significativamente distinto del de las basales no tumorales,cabria esperar que su relación con SU fuese más estrecha que la comprobada para los estratos medios,habida cuenta de que en éstos las células no

son fotométricamente muy distintas de las intermedias de epitelios normales.

Conocida la relación existente entre SU y la variable MD,la segunda variable más relacionada con la supervivencia es IL (infiltración linfoide);el resto de las consideradas:porcentaje de células pobremente diferenciadas,queratinización,número de mitosis por cada diez campos de gran aumento,fibrosis reaccional,cantidad de necrosis,modo de crecimiento y el valor medio de ET para cada caso,no puede decirse que no tengan relación con SU sino que no aportan nada respecto a ella si ya son conocidas MD e IL.

Según la ecuación anteriormente expuesta cuanto mayor sea el valor de MD y menor el de IL la supervivencia será mayor.Cuanto menor sea el valor de MD y mayor el de IL la supervivencia esperada será menor.En nuestro estudio,por tanto,un infiltrado linfocitario abundante es signo de mal pronóstico debiendo interpretarse como una violenta reacción defensiva del huesped frente a tumores histológicamente muy agresivos (KRAUS 1976,MALICKA 1971),por el contrario un infiltrado peritumoral escaso representaria una respuesta leve por parte del huesped frente a un tejido tumoral de comportamiento más benigno.

Conociendo la relación SU-MD es facilmente explicable porqué el valor de la variable Y es mayor en el grupo de supervivencia mayor a cinco años siendo supuestamente el valor de ET en este grupo menor.Si el porcentaje estimado de células moderadamente diferenciadas es mayor,el producto de ET por el número de células moderadamente diferenciadas puede ser alto a expensas de este último factor.

Por la ecuación:

$$SU=29.63+0.51\ MD-347\ IL$$

puede afirmarse que las variables anatomopatológicas MD e IL son superiores desde el punto de vista pronóstico a la variable ET.

A la vista de este resultado,podria pensarse que la morfofotometria es una técnica complicada,poco útil frente a determinadas variables puramente histológicas y que aporta poco o nada en cuanto a la supervivencia del paciente si ya se conocen MD e IL.Sin embargo,el cálculo del grado de malignidad mediante la compleja fórmulade BÖKING (1985) nos hace pensar todo lo contrario.

Lo que esencialmente se busca es un parámetro que elaborado a partir de los datos obtenidos mediante citofotometria,tenga por sí solo el suficiente valor pronóstico como para que,aún prescindiendo de los datos clinicos y/o patológicos podamos conocer,al menos de forma aproximada la evolución posterior del paciente.Este parámetro es el grado de malignidad del DNA (GM),que se obtiene gracias al cálculo del índice de malignidad (IM),el cual no es más que el producto entre el porcentaje de células definitivamente aneuploides (5CER) y el 2CDI que representa la dispersión de los valores citofotométricos con respecto al obtenido en las células diploides (2C).Si consideramos que el epitelio tumoral en el carcinoma epidermoide de laringe se diferencia del normal por su mayor proporción de células aneuploides (STELL 1974) y por la mayor variabilidad de las medidas citofotométricas (BJELKENKRATZ 1983) el índice de malignidad debe entenderse como una medida de estas dos características.

En nuestro estudio se ha modificado el método para el cálculo del porcentaje de células aneuploides empleando como valor 2C la media del valor ET de las células intermedias de epitelios normales +/- dos veces la desviación standard.BÖKING (1985),en cambio,emplea como 5CER el valor 2C+/-12.5% calculado a partir de 20 linfocitos normales en cada preparación (ATKIN 1979,AUFFERMANN 1984,BÖKING 1984).

En nuestro trabajo además de la variable citofotométrica "valor de extinción nuclear"se incluye una variable morfométrica,el tamaño nuclear,ambos constituyen el valor ET.BÖKING(1984,1985) sólo emplea valores citofotométricos obtenidos a partir de preparaciones teñidas con FEULGEN;como consecuencia nuestras medidas morfofotométricas son distintas en valores absolutos a las citofotométricas puras y por tanto están más indirectamente relacionadas con el contenido de DNA nuclear,no obstante,nuestros resultados finales son prácticamente superponibles ya que el fundamento de la técnica permanece invariable.Es por ello por lo que de igual forma que en estudios precedentes (BÖKING 1984,1985) el resultado más llamativo que pudo obtenerse fue que la media de la supervivencia es significativamente distinta para los pacientes con valores de GM superiores o inferiores respectivamente a 2.34.Cuando el grado de malignidad es mayor,el pronóstico es cláramente desfavorable y así para valores de GM entre 2.34 y 3 la supervivencia media esperada es inferior a tres años (34 meses) mientras que cuando GM está entre 1.1 y 2.34 la esperanza de vida se aproxima a los cinco años (58.8 meses).Se demuestra mediante esta forma que mediante morfofotometria es posible obtener una variable (GM) que empleada aisladamente y sin el concurso de otros datos antomopatológicos o clínicos,resulta muy orientativa en cuanto a la supervivencia de los pacientes estudiados.El grado de malignidad es además un dato objetivo obtenido a partir de la elaboración

matemática de medidas efectuadas directamente sobre el nucleo de la célula tumoral y que por tanto no están sujetas a la variabilidad propia de la simple estimación personal.Por todo ello, debe considerarse al GM como uno de los más claros ejemplos de aplicación de la patologia cuantitativa en el estudio en este caso concreto del carcinoma epidermoide de laringe.

En el momento actual,sin embargo,la aplicación de la morfofotometria de forma rutinaria en la valoración histológica de tumores laringeos es utópica.Se trata de un método complejo,laborioso,en muchos casos tedioso y para el que es necesario contar con un material del que no se dispone en la mayor parte de los laboratorios,no obstante,pensamos que puede ser de gran utilidad si pretendemos no solamente dar un diagnóstico,para lo cual la microscopia óptica convencional es más que suficiente,sino además disponer de un dato,en este caso el GM,que muestra una estrecha relación con la supervivencia y que depende exclusivamente de las células epiteliles del tumor en estudio.

5-5.-Análisis de imagen.

Pero si la instrumentación y matematización ya es grande con la plicación de la morfofotometria,ésta llega al extremo con métodos tan sofisticados como el análisis densitométrico de los núcleos de células procedentes del carcinoma epidermoide de laringe.

En fotometria las medidas se llevan a cabo sobre la preparación histológica,por el contrario,en morfometria y densitometria interactiva la imagen se transforma como paso previo en algo tan

matemático como una matriz de representación.Ya no se trabaja con datos analógicos aportados por el aspecto visual de las células tumorales sino con números con los que las posibilidades de transformación son prácticamente ilimitadas.Por todo ello podria considerarse el análisis densitométrico como el método más avanzado en la total objetivización de lesiones anatomopatológicas y el más fiel exponente de la patologia cuantitativa en el momento actual.En cambio nuestros desalentadores resultados nos obligan a poner seriamente en duda su utilidad práctica,al menos con el método empleado por nosotros.El uso de material de archivo teñido con hematoxilina eosina para el estudio morfométrico y densitométrico de los nucleos celulares mediante análisis de imagen con el sistema IBAS-IPS cuenta según nuestra experiencia,con numerosos inconvenientes derivados fundamentalmente de la baja calidad de la imagen obtenida a partir de alguna de las preparaciones que por este motivo hubieron de ser rechazadas.

El principal inconveniente fue la imposibilidad de distinguir en el videomonitor de imagen los epitelios basal,intermedio y superficial facilmente visibles con microscopia convencional y esto a pesar de la preelaboración de las imágenes seleccionadas.Esta dificultad no existió en cambio en el caso de los epitelios normales.

Incluso dentro de preparaciones válidas no todas las areas microscópicas ofrecen una imagen con la suficiente nitidez,por lo que la elección del campo de estudio resultó en ocasiones muy laboriosa.Por este motivo en la mayoria de los casos tumorales el número de nucleos celulares por campo que podian seleccionarse para el estudio morfodensitométrico fue relativamente escaso debiendo aplicarse el programa completo en tres o cuatro campos de la misma preparación histológica en cada

caso,con el consiguiente retraso que esto supone.

Otro de los principales inconvenientes fue la localización de los "pixels" con determinado nivel de gris (operación "feature extractor" del "hardware" auxiliar).

Según nuestros resultados,con el estudio morfodensitométrico no puede distinguirse entre las células de un epitelio laringeo normal y tumoral ya que la superficie y la forma de los nucleos en uno y otro caso son prácticamente superponibles a pesar de la tendencia a una mayor superficie de sección nuclear en las células tumorales.

Este resultado podria atribuirse en un principio,al hecho de que la selección y aislamiento de los nucleos se lleva a cabo de forma manual con el lapiz magnético sobre el tablero digitalizador,método que está sujeto al error personal y a una variabilidad amplia.En contra de esta posibilidad,en cambio,debemos mencionar la reproductibilidad de los resultados obtenidos aplicando el programa varias veces sobre el mismo campo microscópico como estudio preliminar antes de decidir la aplicación de esta técnica.

El valor de transmisión tampoco fue significativamente distinto entre las células tumorales y no tumorales.Este valor de transmisión se obtiene mediante la promediación de los niveles de gris de todos los elementos de imagen incluidos dentro del contorno nuclear.Este cálculo se lleva a cabo de forma automática pero no está del todo exento de error ya que como mencionamos en el capitulo anterior,durante el proceso de localización en el monitor de imagen de los"pixels" con un determinado nivel de gris parte del halo perinuclear participa

inevitablemente en la promediación aunque esta última porción de imagen pueda luego eliminarse manualmente.Hemos de tener en cuenta,no obstante,que a diferencia de lo ocurrido en morfofotometria las medias de las variables expuestas se obtuvieron mediante selección de grupos celulares representativos sin poder distinguir entre los estratos basal,intermedio y superficial.

A pesar de los resultados obtenidos mediante análisis de imagen no puede afirmarse en absoluto que éste no sea útil en anatomia patológica sino que con el método empleado por nosostros y en preparaciones de archivo teñidas con técnicas inespecíficas no es por si solo suficiente para distinguir nucleos tumorales de sus correspondientes normales,por lo que estos resultados deben entenderse como preliminares en el estudio del carcinoma epidermoide de laringe y de ninguna manera nos permiten desechar una técnica de posibilidades casi ilimitadas.

5-6.-Interpretación de la biologia tumoral a través de los resultados morfofotométricos.

Una de las principales tareas de la biologia es la de relacionar la estructura de los tejidos con su función.El estudio de la cinética de las poblaciones celulares puede considerarse como una parcela de la biologia en la que se pretenden aclarar los mecanismos de crecimiento tisular en el tiempo.Su principal objetivo es entender la relación existente entre la proliferación celular imaginada por la observación estática a través del microscopio y en un momento determinado y la capacidad real de crecimiento de todo el tejido.La conexión entre los signos microscópicos de división celular y el crecimiento verdadero de un tejido no es precisamente fácil constituyendo uno de los objetivos que hemos pretendido abordar en las particulares condiciones

del presente trabajo de tesis.

Como consecuencia de la gran cantidad de trabajos experimentales sobre el crecimiento celular de tejidos normales,son múltiples las observaciones que ilustran la complejidad de la relación existente entre proliferación celular y crecimiento tisular.

Está claro que la proporción de células proliferantes en un tejido determinado puede no tener relación con su crecimiento en tamaño.Así por ejemplo,los tejidos formadores de pitelio y células sanguíneas en el animal adulto son lugares de rápida producción,sin embargo,estos tejidos son microscópicamente estáticos.Lo que ocurre es que existe una renovación tisular continua por lo cual la producción aparentemente excesiva es contrarestada por una pérdida natural de células también muy rápida.A este proceso se le conoce con el nombre de "turnover" celular.

Como consecuencia de cambios fisiológicos o patológicos el "turnover" puede aumentar o disminuir considerablemente pero el tamaño del tejido en cuestión permanece relativamente constante.Por este motivo debemos pensar que el crecimiento neoplásico no es sólo el resultado de una proliferación incontrolada,o lo que es lo mismo,el aumento de la proporción de células proliferantes,sino que ha de entenderse como una pérdida de la relación entre producción y pérdida celular.Esta relación es difícil de imaginar a través de signos estáticos visibles con microscopia óptica.Es necesario tener siempre presente que una preparación histológica no es más que la interrupción en el tiempo de una mínima parte del tejido en estudio,el cual está inmerso en un medio biológico del que desconocemos por completo la mayor

parte de sus complejos mecanismos de regulación e interacción con otros tejidos y órganos.Por todo ello es extremadamente peligroso desde el punto de vista científico extraer conclusiones generales a partir de observaciones tan limitadas y parciales.

Como ejemplos de la absoluta discordancia existente entre la cinética celular real de un tejido y su aspecto microscópico pueden citarse los siguientes:

-la observación microscópica del tejido medular de un animal de experimentación nos puede llevar a la conclusión errónea,ante la alta proporción de células proliferantes observadas ,de que existen en él una gran cantidad de células madre o "stem cells",en cambio se calcula que sólo un 1% de las células de la médula osea del ratón y la rata adultos son "stem cells" con una fase intermitótica de aproximadamente 12 horas.

-el estudio óptico de tejidos que han sido radiados,frecuentemente nos lleva a la creencia falsa de que se ha producido una importante disminución de células proliferantes cuando lo que realmente ocurre es que se retrasa temporalmente su capacidad reproductiva;o por el contrario que el efecto de la radiación ha sido escaso por la persistencia de signos microscópicos de división celular comprobándose posteriormente la sucesión de dos o tres generaciones de descendientes en un tiempo menor que el habitual y con una supervivencia extraordinariamente corta.

Los tejidos de renovación más rápida son los más seriamente afectados por los agentes quimioterapeuticos y su respuesta a este daño es difícil de entender atendiendo exclusivamente a los

estudios efectuados con microscopia simple.Algo similar ocurre en el caso de los tumores y de su respuesta a la quimio o radioterapia.

La enorme cantidad de trabajos que se han llevado a cabo sobre cinética celular basados exclusivamente en la observación microscópica convencional no han explicado suficientemente el número variable de células con actividad proliferativa o la diferente respuesta terapeutica de tumores aparentemente iguales desde el punto de vista anatomopatológico.La razón de este fenómeno quizás sea la diferencia existente entre los datos de la observación anatomopatológica convencional y la capacidad potencial no evidenciable,de un ilimitado crecimiento de la célula tumoral.Por esta razón deben considerarse separadamente los aspectos funcionales y morfológicos.

En el momento actual sabemos que toda neoplasia está constituida por un denominado sistema multicompartimental en el que se distinguen dos grandes bloques o compartimentos:el constituido por las células proliferantes y el formado por las células no proliferantes o quiescentes.Dentro de este último grupo se encuentra un número indefinido de células que aun siendo quiescentes tienen capacidad proliferativa pudiendo pasar en un momento dado del compartimentono no proliferativo al proliferativo.

De una forma muy general se admite que el compartimento de células proliferativas en los cánceres humanos es relativamente pequeño no excediendo del 40-50% del total de células que constituyen la tumoración.

La célula proliferante sigue teóricamente un ciclo celular que se repite de forma

continua.Este ciclo está constituido por las fases G1 o postmitótica,S o de síntesis,G2 postsintética o premotótica y fase M o mitótica.

Debido al asincronismo típico de las células tumorales es de esperar que todas las células proliferantes no se encuentren en la misma fase del ciclo.

Hasta ahora la mayor parte de los estudios sobre cinética de células tumorales se basan en la identificación de células en una determinada fase,suponiendo que cuanto mayor sea el número de células en la fase S,G2 y M mayor es la actividad proliferativa de ese tumor y por el mismo motivo peor su comportamiento biológico.Así FEINMESSER (1987) llega a afirmar aplicando técnicas de citofotometria de flujo que puede admitirse que un tumor es tetraploide cuando el porcentaje de células en fase G2 y M es superior al 20%.

Otras técnicas frecuentemente utilizadas son el empleo de agentes bloqueantes(colchicina vinblastina..etc...)para el cálculo del índice mitótico,o el uso de timidina tritiada para el cálculo del tiempo intermitótico,el tiempo de duración de la fase So el porcentaje de células proliferantes marcadas con timidina (STELL 1975).

La base fundamental de las técnicas morfofotométricas,en cambio,es esencialmente distinta,se trata de calcular a traves de la proporción de células definitivamente aneuploides e independientemente de la fase del ciclo en la que se encuentran,el tipo biológico del tumor y su repercusión para el paciente.Desde este punto de vista el estudio morfofotométrico efectuado por

nosotros debe entenderse no solo como la aplicación de una técnica concreta en preparaciones de carcinoma epidermoide de laringe sino como un intento de aproximación al comportamiento dinámico de un tejido que hasta ahora se ha estudiado casi exclusivamente a partir de datos puramente morfológicos.

La microscopia óptica convencional permite ver el carcinoma epidermoide de laringe de una forma parcial y en un momento concreto de su evolución biológica,con morfofotometria en cambio,pueden extraerse datos que aun siendo puramente morfológicos nos permiten,tras su elaboración matemática,hacernos una idea muy aproximada del comportamiento dinámico del tejido tumoral.

En nuestro caso a través del estudio del tamaño y del valor de extinción nuclear de las células tumorales se ha obtenido el valor ET que relaciona ambas variables.Comparando el valor de ET de cada célula tumoral con un valor ET patrón de células normales se ha calculado el porcentajede células,del total de células estudiadas en cada caso que se apartan ampliamente del valor 2C.

Los nucleos celulares no incluidos en el rango de valores antes mencionado se suponen definitivamente aneuploides (5CER).Sorprende comprobar la extraordinaria variabilidad del valor 5CER en los cincuenta casos de carcinoma epidermoide laringeo a los que se ha aplicado morfofotometria.Este valor oscila entre el 75% para el caso 22 y el 3% para el caso 26,con un valor medio de 29.34%.Podemos afirmar,por tanto,que según nuestros resultados,en el carcinoma epidermoide de laringe por término medio sólo una tercera parte del total de células pueden considerarse por su contenido nuclear como cláramente aneuploides(Gráfica 14a y b).

La explicación de este hecho quizas estribe en que en la mayor parte de los tumores estudiados por nosotros son perfectamente distinguibles los tres estratos:basal,intermedio y superficial del epitelio plano poliestratificado normal.Parece,por tanto,que de la misma forma que ocurre en el epitelio laríngeo normal,en el carcinoma epidermoide las células de los estratos medios y superficiales no serian más que el resultado de la maduración progresiva de las células del estrato basal,únicas con claros atributos morfofotométricos de malignidad.Este hecho explica el que sean precisamente los valores de ET de las células basales tumorales las únicas significativamente distintas a las células basales normales no ocurriendo lo mismo en el caso de las células intermedias y superficiales.En cambio sí fueron significativamente distintos los valores de ET de las células basales intermedias y superficiales entre sí,tanto en los casos tumorales como en los no tumorales.

El fracaso de nuestro método de análisis de imagen en la obtención de resultados positivos quizás se deba precisamente a la imposibilidad de distinguir los nucleos pertenecientes a cada uno de los estratos en la imagen en gris del videomonitor,no pudiendo establecer comparaciones entre los estratos correspondientes en los casos tumorales y no tumorales sino de una forma más grosera promediando los valores de transmisión de la población celular global en cada caso.

Aunque muy importante,el porcentaje de células definitivamente aneuploides no es el único dato dinámico calculable mediante morfofotometria.

La célula tumoral a diferencia de la célula normal,tiene como una de sus principales

características la de no estar sujeta a controles biológicos de ningún tipo lo cual permite al tejido tumoral un crecimiento rápido e independiente desoyendo los mecanismos de "feed-back" vigentes para el resto de los tejidos del organismo.Esta característica fundamental dela célula tumoral se evidencia morfofotométricamente por la extraordinaria variabilidad de las medidas obtenidas en los parámetros estudiados.Es por ello por lo que en nuestra opinión deben tenerse en cuenta no solo los valores absolutos sino también la variabilidad de las medidas morfofotométricas obtenidas con respecto a las de la célula normal tomadas como referencia.Precisamente el valor 2CDI es una medida de esta variabilidad.

El índice de desviación de 2C (2CDI) no es más que la medida de las desviaciones cuadradas del valor de ET de las células tumorales con respecto al de las normales tomado este último como valor 2C.

Al contrario de lo que podria esperarse en un principio no siempre el mayor valor de 5CER coincide con el mayor valor de 2CDI,o lo que es lo mismo,no siempre los casos con un porcentaje de células definitivamente aneuploides mayor tiene un índice de variabilidad de ET con respecto al correspondiente a las células euploides (2C) también mayor.Ambos parámetros son la base de nuestro estudio para el cálculo del índice y grado de malignidad, de un claro valor pronóstico.

6 CONCLUSIONES

1.-Los resultados del estudio anatomopatológico convencional con microscopia óptica simple son superponibles a los obtenidos por otros autores.Es de destacar,sin embargo,que la infiltración perineural,la presencia de émbolos tumorales en los vasos sanguineos y linfáticos y el patrón histológico ganglionar son en nuestra opinión de escaso valor por ser parámetros de observación dificil y dudosa interpretación,aportando poco o nada al conjunto de datos clínicos y anatomopatológicos que constituyen la valoración global del paciente con cancer laríngeo.

2.-La aplicación de técnicas objetivas de patologia cuantitativa,concretamente la morfofotometria,en el estudio de preparaciones de archivo de carcinoma epidermoide de laringe es de gran utilidad ya que nos permite obtener,a partir de datos puramente morfológicos un gran número de medidas que convenientemente manipuladas resultan de un extraordinario valor pronóstico y dan una visión más dinámica de la población celular en estudio.

3.-Del estudio morfofotométrico y microscópico convencional puede desprenderse que en la mayor parte de los casos de cancer laringeo las células tumorales se distribuyen en tres estratos:basal,intermedio y superficical al igual que ocurre en el epitelio plano poliestratificado normal de este órgano,de ellos son precisamente las células tumorales del estrato basal las que presentan más atributos morfofotométricos de malignidad,mostrándose distintas a las célulasas basales del estrato normal,a diferencia de lo que ocurre con las células de los estratos medios y superficiales.Por todo ello pensamos que las células tumorales del estrato basal también siguen un proceso de maduración progresiva al tiempo que ascienden a los estratos más superficiales

perdiendo de esta forma sus características morfofotométricas de malignidad.

4.-La variable morfofotométrica ET resultante del producto del valor de extinción por el tamaño nuclear se encuentra estrechamente relacionada con las demás variables anatomopatológicas convencionales,siendo esta relación más estrecha con el grado de diferenciación,queratinización y número de mitosis por cada diez campos de gran aumento,las cuales dependen exclusivamente de la población de células epiteliales del tumor en estudio.

5.-Mediante la manipulación de los resultados morfofotométricos,concretamante del cálculo del indice de desviación del valor euploide y del porcentaje de células definitivamente aneuploides,se demuestra la extraordinaria variabilidad de la población de células proliferantes en el carcinoma epidermoide de laringe,la cual se encuentra emascarada por su aparente uniformidad histológica.De esta forma la morfofotometria se convierte en una técnica de extraordinario valor para el estudio de la cinética de poblaciones celulares a través de datos páramente morfológicos.

6.-El grado de malignidad obtenido a través de datos morfofotométricos es de gran valor pronóstico como parámetro aislado,siendo su relación con la supervivencia superior a la existente entre ésta y el grado de diferenciación como porcentaje estimado de células bien,moderadamente y pobremente diferenciadas.Se demuestra de esta forma,mediante esta técnica la posibilidad de establecer una relación directa y estadísticamente significativa entre los datos obtenidos exclusivamente a partir de células epiteliales tumorales y la supervivencia del

paciente,prescindiendo del resto de las variables anatomopatológicas concencionales.

7.-Mediante regresión lineal múltiple se comprueba que del conjunto de variables anatomopatológicas estudiadas e incluida como variable morfofotométrica la media del producto del valor de extinción por el tamaño nuclear en cada caso,la más estrechamente relacionada con la supervivencia del paciente a los cinco años es el porcentaje estimado de células moderadamente diferenciadas siendo esta relación directa.Conocido este hecho el segundo parámetro más estrechamente relacionado con la supervivencia es la infiltración linfoide peritumoral,siendo en cambio,inversa esta segunda relación.Puede concluirse,por tanto,que el resto de las variables evaluadas aportan poco o nada en cuanto al conocimiento de la supervivencia del paciente se refiere si ya son conocidos el porcentaje de células moderadamente diferenciadas y la infiltración linfoide,lo cual puede expresarse de formaecuacional mediante la fórmula:

SU=29.63+0.51 MD-347 IL

8.-Como consecuencia de la ausencia de resultados positivos , concluimos que el estudio morfodensitométrico o por análisis de imagen de preparaciones de archivo de carcinoma epidermoide de laringe con el método seguido por nosotros no aporta ningún dato adicional a los resultados morfofotométricos e histológicos convencionales.No obstante y a pesar de lo anteriormente expuesto creemos que se trata de una técnica con innumerables posibilidades en el estudio de imágenes anatomopatológicas que permitirá en un futturo la creación de sistemas a través de los cuales podrá estudiarse cada caso,no de forma aislada sino en relación con las características histológicas

y evolutivas del grupo de pacientes con el mismo diagnóstico anatomopatológico.

7 BIBLIOGRAFIA

ABEMAYOR,E.,JUNG,B.,LARSSON,S.,WARD,P.,HANAFELE,W.(1985):"Ct-directed fine needle aaspiration biopsies of masses in the head and neck".Laryngosccpe.95:1382-1386.

ADLER,D.,MAIER,H.,PAUL,K.(1985):"Kongenitales condrom des larynx".Laryngol.Rhinol.Otol.64:459-460.

ALBERTINI (1955):cit.LOPEZ AGUADO (1975).

ALGABA,J.(1988):"Recuperación de la voz en los laringectomizados.Fistuloplastias y prótesis fonatorias".Ponencia oficial de la XXVIII reunión de la Sociedad Española de Otorinolaringologia y patologia cervico-facial.

ALLSBROCK,W.,HARMON,D.,CHUNGCHITNANT,N.,ERWIN,S.(1985):"Liposarcoma of the larynx".Arch.Pathol.Lab.Med.109:294-296.

ALONSO (1957):CIT ALONSO(1961).

ALONSO,J.M.(1964):"Tratado de otorinolaringologia y broncoesofagologia"Ed. Paz Montalvo. Madrid.

ARETEO.(año 100 d. de J.C.):cit. Silver (1985).

ARIYAN,S.,KRIZEK,T.,MITCHELL,M.(1977):"Identification of squamous cell carcinoma of the head and neck by tissue culture and immunologic testing".Plast.Reconstr.Surg.59:386.

ATKIN,N.,KAYR,B.(1979):"Rapid diagnostic DNAcytometry with an automatic microscope and tv-image analysis system".Analyt.Quant.Cytol.6:179-188.

ATKING,N.,KAY,R.(1987):"Prognostic significance of modal DNA value and other factors in malignant tumors,based on 1465 cases".Br.J.Cancer.40:210-221.

AUDOIN,J.,DIEBOLD,J.(1986):"Modifications histologiques des ganglions lymphatiques au cours des reacctions de stimulation immunitaire".Ann.Pathol.6:85-98.

AVELLANEDA,R.(1985):"Carcinoma de laringe".Medicina Clinica.85:673-677.

AVERY (1828):cit. SILVER (1985).

BABINGTON (1807):cit. silver (1985).

BACLESSE (1939):cit. ALONSO (1964).

BAILEY,B.,BILLER,H.(1985):"Surgery of the larynx".Ed. Saunders Company.Philadelphia.

BAK-PEDERSEN,O.,NIELSEN,K.(1982):"Mucus producing elements in the normal adult human larynx".Acta Otolaryngol,suppl.386:170-172.

BAK-PEDERSEN,O.,NIELSEN,K.(1986):"Subepithelial mucous glands in the adult human larynx".Acta Otolaryngol. (Stockh.).102:341-352.

BALLANTYNE,A.(1985):"Perspectives in head and neck cancer".The Am.J. of Surg.404-405.

BALM,F.,VON BLOMBERG,B.,DREXHAGE,H.,HAAN-NEUMAN,M.,SNOW,G.(1984):"Mono nuclear phagocyte function in head and neck cancer:depression of murine macrophage accumulation by low molecular wecht factors derived from head and neck cancer".Laryngoscope.94:223227

BARDY,J.,SHARKEY,F.(1986):"Morphometric grading of squamous cell carcinoma".Hstopathology.10:1143-1152.

BARGMAN,W.(1968):"Histologia y anatomia microscópica humana".Ed. Labor.S.A. Barcelona.

BARLOGIE,B,RABER,M.,SCHUMANN,J.,JOHNSON,T.(1980):"Flow cytometry in clinical cancer research".Cancer Research.13:3982-3997.

BARLOGIE,B.,JOHNSON,D.,SMALLWOOD,L.,RABER,M.,MADDOX,A.,LAT REILLE,J.(1982):"Prognostic implications of ploidy and proliferative activity in human solid tumors".Cancer Genet.Cytogenet.6:17-28.

BARRES,D.(1985):"Validite des methodes de mesure d'ADN intranucleaire sur cape fine.Etude theorique et experimentale".Ann.Pathol.5:259-264.

BARRY,J.,SHARKEY,F.(1985):"Oserver reprroducibility during computer-assisted planimetric measurements of nuclear features".Human Pathology.16:225-227.

BARTUAL (1969):cit. BARTUAL (1975).

BARTUAL,J.,MARCO,J. y SACRISTAN,T.(1975):"Cancer laringeo y faringolaringeo".Ponencia oficial del IX congreso nacional de la Sociedad Española de Otorrinolaringologia y patologia cervico-facial.

BATSAKIS,J.(1979):"Tumors of the head and neck clinical and pathological considerations".Williams and Willkins.London.

BATSAKIS,J.(1984):"Invasion of the microcirculation in head and neck cancer".Ann Otol.Rhinol.Laryngol.93:646-647.

BATSAKIS,J.(1985):"Nerves and neurotropic carcinomas"Ann.Otol.Rhinol.Laryngol.94:426-427.

BATSAKIS,J.,COHEN,J.,GUILLAMONDEGUI,O.,MEDINA,J.(1985):"Cancer of the minor salivary glnds of the larynx".The American Journal of Surgery.150:513-518.

BATSAKIS,J.,LUNA,M.,BYERS,R.(1985):"Metastases to the larynx".Head and Neck Surg.7:458-460.

BATTIFORA,H.(1976):"Spindle cell carcinoma.Ultrastructural evidence of squamous origin and collagen production by the tumor cells".Cancer 37:2275-2282.

BAUER,W.,MACGAVRAN,M.(1972):"Carcinoma "in situ" avec avaluation of epitelial changes in laryngopharyngeal biopsies".JAMA.221,1:72-75.

BECKER,W.,NAUMANN,H.,PFATZ,C.(1986):"Otorrinolaringologia" .Vol II.Ed.Doyma.Barcelona.

BENIS (1944):cit. BAILLEY y BILLER (1985).

BENNET,S.,FUTRELL,J.,ROTH,J.,HOYE,R.(1971):"prognostic significance of histologic host response in cancer of the larynx or hypopharynx".Cancer 28:1255-1265.

BERGER,G.,HARWOOD,A.,BRYCE,D.,VAN NOSTRAND,P.(1985):"Primary subglotic carcinoma masquerading clinically as glottic carcinoma a report of a nine cases".Journal of Otolaryngology.14:1-6.

BERGER,W.,GLODSTEIN,J.,STRAWBERRY,C.(1984):"Clinical experience in managing head and neck squamous carcinoma".Ear Nose and Throat.63:591-596.

BERLINGER,N.(1984):"Deficient immunity in head and neck cancer".Laryngoscope.94:1407-1410.

BERLINGER,N.,MALONE,N.,KAY,N.(1987):"A comparison of flow cytometric DNA analyses of fresh and fixewd squamous cell carcinomas".Arch.Otolaryngol.Head and Neck Surtg.113:1301-1306.

BERLINGER,N.,TSAKRKLIDES,V.,POLLAK,K.ADAMS,G.,YANG,M.,GOOD ,R.(1976):"Immunologia assessment of regional lymph node histology in relation to survival in head and neck carcinoma".Cancer.31:860.

BICHAT(1771-1802):cit. WELSH (1983).

BILLROTH (1873):CIT SILVER (1985).

BING,I.,HEMMO,A.,DREXHAGE,A.(1986):"Defective monocyte chemotaxis in patients with head and neck cancer".Arch.Otolaryngol. Head and Neck Surg.112:541-544.

BJELKENKRANTZ,K.,LUNDGREN,J.,OLOFFSON,J.(1983):"Single cell DNA measurements in hyperplastic dysplastic and carcinomatous leryngeal epithelia with special reference to the ocurrence of hypertetraploid cell nuclei".Analyt.Quant.cytol.5:184-188.

BJELKENKRANTZ,K.,LUNGREN,J.,OLOFFSON,J.(1983):"Single cell DNA measurements in hyperplastic displastic and carcinomatous laryngeal epithelia with special reference to the ocasane of hypertetraploid cell".Analyt.Quant.Cytol.5:184-188.

BLACK (1956):cit. BERLINGER (1976).

BLACK,R.(1985):"Head and neck cancer staging systems a comparison between UICC andd AJC".Aust.N.Z.J.Surg.55:276-279.

BLOOM and FAWCWTT.(1978):"Tratado de histologia".Ed.Labor.Barcelona.

BOCCA y PIGNATARO (1967):cit. GAVILAN (1972).

BOERHAAVE (1688):cit. SILVER (1985).

BOON,M.,LOWHAGEN,T.,CARDUZO,P ,BLONK,D.,BAAK,J.(1982):"Com putation of preoperative diagnosis probability for follicular adenoma and carcinoma of the thyroid on aspiration smears".Analytical and Quant.Cytol.4:1.

BOTTINI (1875):cit. SILVER (1985).

BOWEN (1912):cit. BAUER (1972).

BOXALL,J.,PROOPS,W.,MICHAEL,L.(1986):"An investigation of the squamous cell epithelium of the human larynx by the metod of tissue culture".The J.Otolaryngol.15:85-88.

BOYSEN,M.,NATVIG,K.,WINTHER,F.,TAUSJÖ,J.(1985):"Value of rutine follow up in patients treated for squamous cell carcinoma of the head and neck".Journal of Otolaryngology.14:211-214.

BRODERS (1932):cit. BERLINGER (1976).

BRODERS(1927):cit FERLITO (1976).

BROWN,D.,BAO,B.,TURNBULL,D.,HEENEMAN,H.,FACS,F.(1985):"Lar yngeal chondrosarcoma:gros pathological,histologic and electron microscopic characteristics".The Canadian Journal of Surgery.28:534-536.

BRÖNING (1910):cit. PAPARELLA y SCHUMRICK (1987).

BÖHEIM,K.,SCHARZFURTNER,H.,BÖHEIM,C.,FREI,E.,BERNAL,B.(198 6):"Immunohistochemical identification of squamous carcinoma of the head and neck with monoclonal antibody SQM 1".Acta Otolaryngol.(Stockh).102:333-340.

BÖKING,A.,ADLER,C.,COMMEN,H.,HILGARTH,M.,GRANZEN,B.,AUFFER MAN,W.(1984):"Algorithm for a DNA-citophotometric diagnosis and grading of malignancy".Analyt.Quant.Cytol.6:1-8.

BÖKING,A.,ADLER,C.,COMMON,H.,HILGARTH,M.,GRANZER,B.,AUFERM ANN,W.(1984):"Algorithm for a DNA cytophotometric diagnosis and grading of malygnancy".Analyt.Quant.Cytol.6:1-8.

BÖKING,A.,AUFFERMAN,W.,VOGEL,H.,SCHLÖNDORFF,G.,GOEBELS,R.(1985):"Diagnosis and grading of malignancy in squamous epithelial lesions of the larynx with DNA cytophotometry".Cancer.56:1600-1604.

CARTER,L.(1985):"Patterns and mechanisms of located bone invasion by tumors:studies with squamous carcinomas of the head and neck".Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.22:275-315.

CARTER,R.,BARR,L.,O'BRIEN,C.,SOO,K.,SHOW,H.(1985):"Transca psular spread of metastatic squamous cell carcinoma from cervical lymph nodes".American Journal of Surgery.150:495-499.

CARTER,R.,BURMAN,J.,BARR,L.(1989):"Immunohistochemical localization of basement membrane type IV collagen in invasive and metastatic squamous carcinomas of the head and neck".Journal of Pathology.147:159-164.

CLAROS,P.,VISCASILLAS,S.,CLAROS,A.,CLAROS,A.(1985):"Lympha ngioma of the larynx as a cause of progresive dyspnea".International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology.9:263-268.

CLERF,L.(1980):"Cancer of the larynx:an analysis of 250 operative cases".Am.J.Surg.142:525.

CLOSE,H.,BURNS,D.,REISCH,J.,SCHAEFER,S.(1987):"Microvascul ar invasion in cancer of the oral cavity,oropharynx and larynx".Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg.114:1191-1195.

COHEN (1892:cit. SILVER (1985)

COUTARD (1927):cit ALONSO (1961).

COYAS,A.,ELIADELLIS,E.,ANASTASSIADES,O.(1983):"Kaposi's sarcoma of the larynx".The Journal of Laryngology and Otology.97:647-649.

CRILE (1966):cit. BAILEY y BILLER (1985)

CRISMAN,H.,ORLICKY,D.,KISSANE,J.(1980):"Use of two parameter (DNA and cell size)flow cytometric analysis for determining the effects of potential chemotherapeutic agents".Flow Cytometry.4:526-530.

CULPIN,D.,MORRIS,U.(1985):"Pattern of DNA synthesis and ist effect on the classification of cells by flow cytometry".Cell Tissue Kinet.18:1-12.

CZERMACK (1855):cit. SILVER (1985).

DALBY,J.,COCKE,E.(1976):"Premalignant laryngeal lesions carcinoma in situ and superficial carcinoma management by radiotherapy".J.Otolaryngol.6:363-369.

DANIELSON,J.,WILBUR,PH.,FRANKLIN,A.(1987):"Characterizatio n of antibody forming cells adjacent to laryngeal carcinoma".Arch.Otolaryngol.110:327-328.

DAWSON,D.,EVERTS,E.,VETTO,R.,BURGER,O.(1985):"Assessment of immunocompetent cell in patients with head and neck squamous cell carcinoma".Ann.Otol.Rhinol.Laryngol.94:342-345.

DE SANTO,L.(1985):"Cancer of the supraglottic larynx.A review of 260 patients".Otolaryngol.Head and Neck Surg.93:705-711.

DE SANTO,L.,DOYLE,P.,FLORES,A.(1976):"Carcinoma in situ of the larynx".Laryngoscope.87:310-314.

DE SANTO,L.,HOLT,J.,BEAHRS,O.,FALLON,W.(1982):"Neck dissection:is it worthwhile?".Laryngoscope.92:502-506.

DE SANTO,L.,NEEL,H.(1985):"Squamous cell carcinoma metastases to the neck from an unknown or undiscovered primary".Otolaryngologic clinic of North America.18:505-513.

DE VRIES,N.,KALTER,P.,SNOW,G.(1986):"Multiple primary tumors in patients with laryngeal squamous cell hyperplasia".Arch.Otorhinolaryngol.243:143-145.

DELAHUNTY (1968):cit. LOPEZ AGUADO (1975).

DEMARD,F.,SANTINI,J.,ETTORE,F.,PHILIP,C.,RASPALDO,H.,VALLI CIONI,J.(1987):"Aspects histologiques et signification prognostique de la reaction immunitaire regionale dans les carcinomes des voies aerodigestives superiores".Ann.Otolaryng.104:501-507.

DEROUT,J.,BRUX,J.,LROUT,R.(1964):"Etude histologique et statistique des dysplasies du larynx et leurs rapport avec les cancers"Ann.Otolaryng.81:12,789-800.

DESAULT (1810):cit. SILVER (1985).

DIAZ FLORES,L.,ORTIZ,G.,SANCHEZ,G.(1974):"Bases ultraestructurales en citologia,histologia y anatomia patológica".Ed.Paredes. Santiago de Compostela.

DIRE y LANE (1963):cit. BERLINGER (1976).

DIXON,B.,CARTER,C.(1980):"DNA microdensitometry and flow cytometry of human tumours biopsies".Flow Cytometry.4:427-230.

DRAFOR,J.,SMITH,M(1981):"Applied linear regression".Ed. WILEY.nEW yORK.

EBLE,J.,HULL,M.,BOJRAB,D.(1985):"Laryngeal blastoma".Am.J.of Clin.Pathology.84:378-385.

FKKERHARD,A.(1986):"Inmunologia.Nuevos Avances".Instituto de ciencias del hombre.Madrid.

ENEROTH,C.,MOBEGER,G.(1973):"Histological malignanci grading of squamous cell carcinoma of the palate".Acta Otolaryngol (Stockh.).75:293.

ENGLEMAN,E.,WARNKE,R.,FOX,R.,BENICKE,C.,LEVY,R.(1981):"Stu dies of human T lymphocyte antigen recognized by a monoclonal antibody".Proc.Natl.Acad.Sci. USA.78:1791-1795.

ERLIG,P.(1908):cit. EKKERHARD (1986).

ESQUIVIAS,J.,GARCIA DEL MORAL,R.(1897):"Estudio morfofotométrico de 66 casos de L.N.H. clasificados según la W.F. y comparación con sus contrapartidas celulares benignas".Sangre.32:288-298.

ESQUIVIAS,J.,GARCIA DEL MORAL,R.(1986):"Innterpretación de la modulación linfoide en el centro folicular.Analisis morfofotométrico sobre preparaciones de archivo".Sangre.31:521-533.

FALLON,J.,PYCOCK,D.,TAYLOR,J.(1978):"Quantitative cytophotometry and image analysis with the magiscan".The J. of Histochemistry and cytochemistry.27:1382-1383.

FANTOZZI,R.,BONE,R.,FERNSTEN,PH.,WALKER,L.(1986):"Upper aerodigestive neoplasm perpetuated in the nude mouse".Laryngoscope.96:621-624.

FENESLAU,A.,MELLOR.(1976):"Grouth stimulation of culture endothelial cells by tumor cell homogenates".Cancer Res.36:3269.

FERLITO (1974):cit. FERLITO (1976).

FERLITO,A.(1976):"Histological clasification of larynx and hypopharynx cancers and their clinical implications".Acta Otolaryngologica.Suplement 342.

FERLITO,A.,CARUSO,G.(1984):"Secondary malignant melanoma of the larynx.Report of two cases and review of 79 laryngeal secondary cases".O.R.L. J.46:117-133.

FERLITO,A.,SALA,O.(1976):"Morphological observations of immunobiology of laryngeal cancer".Acta Otolaryngol.81:353-363.

FEULGEN y ROSSENBECK (1924):cit.BÖKING (1985).

FINN,D.,GOEPFERT,H.,BATSAKIS,J.(1984):"Chondrosarcoma of the head and neck".Laryngoscope.94:1539-1544.

FOSSA,S.,KAALHUS,O.(1976):"Nuclear size and chromatin concentration in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder".Beitr.Pathol.157:109.

FRAZIER (1909):cit. ALONSO (1964).

FRIEDMAN,W.,ROSENBLUM,B.,THORNTON,H.,LOEWENSTEIN,P.,KATSAN TONIS,G.,GREEN,M.(1985):"Oncogenes:their presence and significance in squamous cell cancer of the head and neck".Laryngoscope.95:313-315.

FRIEDMANN,I,OSBORN,D.(1976):"The larynx in systemic pathology".Ed W.St.C. Symmers. Vol.I.Edinburg.

FÖDERL (1899):cit. ALGABA (1988).

GALENO.(año 200 d. de J.C.):cit. SILVER (1985).

GANTER,P.,JOLLES,G.(1969):"Histochimie normale et pathologique".Gauthier-Villars.Paris.

GATTI,R.,GOOD,R.(1971):"Ocurrence of malignancy in immunodeficiency disease.A literature review".Cancer.28:89.

GAVILAN ALONSO,C.,BLANCO GALDIN,A.y SUAREZ NIETO,C.(1972)"Vaciamiento funcional radical cervicoganglionar.Anatomia quirúrgica,técnica y resultados".Acta O.R.L. Iber. Amer. XXIII.

GERRIER, Y.,ANDRE,P.,PINEL,J.(1964):"Otorhinolaringologie et gros vaisseaux du cou.Librerie Arnelte.Paris.

GIL,J.,MARCHEWSKY,A.,SILAGE,D.(1986):"Application of computerized interactive morphometry in pathology I.A model for computer generated diagnosis".Lab.Invest.54:222.

GLÖCK y SORENSON (1896):cit.ALGABA (1988).

GOELLNER,J.,DEVINE,K.,WEILAND,L.(1973):"Pseudosarcoma of the larynx".Am.J.Clin.Pathol 59:312-326.

GORMAN,S.,HOFFMAN,E.,NICHOLS,W.,CRISTOFALO,V.(1984):"Spont aneous transformation of a cloned cell line of normal diploid bovine vascular endothelial cell".In Vitro.20:339.

GORMLEY,P.,PRIMROSE,W.,BHARUCHA,H.(1985):"Subglotic plasmocytoma of the larynx.An acute presentation".The Journal of Laryngol.Otol.99:925-929.

GRANDI,C.,ALLOISIO,M.,MOGLIA,D.,POPRECA,S.,SALA,L.,SALVATORI,P.,MOLINARI,R.(1985):"Prognostic significance of lymphatic spread in head and neck carcinomas:therapeutic implications".Head and Neck Surgery.8:67-73.

GROVE,G.(1979):"Application of microspectrophotometry to biomedical research".The Journal of Histochemistry and Cytochemistry.27:1375-1376.

GRÖNTOFT,O.,HELLQUIST,H.,OLOFFSON,J.,NORSBRÖM,G.(1978):"The DNA contens and nuclear size in normal dysplastic and carcinomatous laryngeal epithelium".Acta Otolaryngol.86:472-479.

GURDON BUCK (1851):cit. SILVER (1985).

GUSSEMBAUER (1873):cit. ALGABA (1988).

HAJECK (1891):cit. WELSH (1983).

HAMLIN,P.WESTERHOLM,P.,MORSON,B.(1986):"Possible host resistence in carcinoma of the larynx:a histological study".Br.J.Caner.42:384-389.

HANNA,G.,ALI,M.(1986):"Chemodectoma of the larynx".The Journal of Otolaryngology and Otology.199:1081-1087.

HANSEN,B.(1986):"An integrated perception of autoinmunity and cancer".Medical Hypotheses.19:79-82.

HAREL,G.,SHVIRO,J.,AVIDOR,J.SEGAL,K.,SIDI,J.(1985):"Laryngeal granullar cell tumor in children."Am.J.Otolaryngol.6:32-34.

HARABUCHI,Y.,YAMANAKA,N.
KATAURA,A.(1985):"Identification of lymphocite subsets and natural killer cells in head and neck cancers".Arch.Otorhinolaryngol.242:89-97.

HARGETT,S.,WANEBU,H.,PACE,R.,KATZ,B.,SANDO,J.,CANTRELL,R.(1985):"Interleukin-2 production in head and neck cancer patients".American Journal of Surgery.150:456-460.

HARTMANN,W.,BEISKER,W.,EISERT,R.(1980):"Fluorescence polarization measurements on human lymphocytes from patients with and without neoplasia".Flow Cytometry.4:183-186.

HAYES MARTIN (1951):cit. BAILLEY y BILLER(1985).

HELLQUIST,H.,OLOFFSON,J.,GRÖNTOFT,O.(1988):"Carcinoma in situ and severe dysplasia of the vocal cords".Acta Otolaryngol.92:543-555.

HIRATSUKA,H.,IMAMURA,M.,KASAY,K.(1984):"Lymphocite subpopulation and T cell subsets in human oral cancer tissues immunohistologic analysis by monoclonal antibodies".Am.J.Clin.Pathol.81:464-470.

HIRSCH,B.,JOHNSON,J.,RABIN,B.,THEARLE,B.(1983):"Immunostim ulatio of patients with head and neck cancer".Arch.Otolaryngol.109:298-301.

HLM,L.,LUNDQUIST,P.,SILFVERSWARD,C.,SOBIN,A.(1982):"Histol ogical grading of malignancy in squamous cell carcinoma of the oral tongue".Acta Otolaryngol.94:185-192.

HOFSTADTER,F.,DELGADO,R.,MIKUZ,G.(1984):"DNA Feulgen cytophotometric analysis of supine cells isolated from paraffin embedded tissue".Path.Res.Pract.179:92-94.

HOLGATE,C.,JACKSON,P.,POLLARD,K.,LUNNY,D.,BIRD,C.(1986):"E ffect fixation on T and B lymphocite surface membrane antigen demostration in paraffin processed tussue".Journal of Pathology.149:293-300.

HOLSBECK,T.,STESSENS,R.,OYEN,R.,WILMS,G.,BAERT,A.(1985):"C t diagnosis of larynx chondrosarcoma.Europ.J.Radiol.5:297-299.

HOSEMAN,W.,SCHERKE,P.(1985):"Malignant fibrous histiocytoma presenting as a pulsating tumor of the neck and diagnosed by intraarterial digital subtraction angiography (IADSA)".H.N.O.(1985).33:380-382.

HOUCK,J.,PANJE,W.,MCCORMICK,K.,MERRICK,R.(1983):"Immunomodulatory activity in regional lymph nodes".Arch.Otolaryngol.109:785-788.

HOWARD,J.,LA SORE,A.(1980):"Linfangioma of the head and neck report of one case and review of the literature".Am.J.Surg.115:593-607.

HUANG,CH.,BLITZER,A.,ABRAMSON,M.(1986):"Collagenase in monolayer cultures".Annals of Otology,Rhinology and Laryngology.95:158-161.

HUSBY,G.,HOAGLAND,P.,STRICKLAND,R.,WILLIAMS,R.(1976):"Tissue T and B cwll infiltration of primary and metastatic cancer".J.Clin.Invest.57:1471-1482.

ISAMBERT (1876):cit. SILVER (1985).

JACKSON (1910):cit.PAPARELLA y SCHUMRICK (1987).

JACOBS,J.,SPITZNAGEL,E.,SESSIONS,G.(1985):"Staging parameters for cancers of the head and neck a multifactorial analysis".Laryngoscope.95:209-212.

JAKOBSON,P.,KILLANDER,D.,FENNER,M.(1972):"The influence of histological grading on prognosis in carcinoma of the larynx". lin.Radiol.17:384.

JAKOBSSON,P.,ENEROTH,C.,KILLANDER,D.,MOBERGER,G.,MARTENSSON,B.(1973):"Histologic clasification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx".Acta Radiol.(thor)12,1.

JAKOWSKI,T.,BAHR,G.,WIED,G.(1971):"Computer recognition of cells from asymptomatic lymphocytic leukemia".Acta Cytol,15:147-167.

JESSE,R.,BALLANTYNE,A.,LARSON,D.(1978):"Radical or modified neck dissection:a therapeutic dilemma".Am.J. of Surg.132:516-519.

JOHNSON,J.,MYERS,E.,BEDETTI,C.,BARNES,L.,SCHRAM,V.,THERLE,P.(1985):"Cervical lymph node metastasis.Incidence and Implications of extracapsular carcinoma".Arch.Otolaryngol.111:534-537.

KALTER,P.,DELAMARRE,F.,ALONS,C.,MEYER,J.,SNOW,G.(1986):"Th e clinical relevance of classification of squamous cell hyperplasia of the larynx by morphometry.Acta Otolaryngol.(Stockh.).101:331-340.

KIELY,E.,GREALLY,M.,GREALLY,J.(1972):"On the significancee of lymphoid cell infiltration in hypernephromas".Irish J.Med. S.c.141:108-118.

KILLANDER,R.,KOMORN,R.(1976):"Cellular reaction in the tissue surrownding laryngeal carcinoma".Otolaryngol.Pol.29:17-21.

KILLIAN (1912):cit. PAPARELLA y SCHUMRICK (1987).

KIRCHNER,J.(1984):"Invasion of the framework by laryngeal cancer".Acta Otolaryngol.97:392-397.

KIRCHNER,J.,CORNOG,J.,HOLMES,R.(1974):"Transglottic cancer.Its growth and spread within the larynx".Arch.Otolaryng.99:247-251.

KIRSTEIN,A. (1895):cit. PAPARELLA y SCHUMRICK (1987).

KLEINSASSER (1958):cit.PRADES (1971).

KLEINSASSER,O.(1962) "die fründiagnose des kehlkopfkarcinomas habilitationschrift".Arch.Ohren Nasen U.kehlkopfheilk.174:210-242.

KLUYSKENS (1969?):cit. ALGABA (1988).

KRAUS,F.,PEREZ MESA,C.(1976):"Verrugous carcinoma clinical and patnological study of 105 cases involving oral cavity,larynx and genitalia".Cancer 19:26.

KRISHABER (1879):cit. SILVER (1985).

KÖELER and MILSTEIN (1975):"Continuous cultures of fuses cells secreting antibody of predigited specificity.Nature.256:425.

LAIN ENTRALGO,P.(1978):"Historia de la medicina".Ed.Salvat.Barcelona

LARDI (1963):cit. LOPPEZ AGUADO (1975).

LEDBETTER,J.,EVANS,R.,LIPINSKI,M.(1981):"Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocyte helper/inducer and cytotoxic/suppresor subpopulations in mouse and man".J.Exp.Med.153:310-323.

LEFOR,A.,BRENDENBERG,E.,KELLMAN,R.,AUST,J.(1985):"Multiple malignancies of the lung and head and neck".Arch.Surg.121:265-270.

LEONARDO DA VINCI (S. XV-XVI):cit. GARCIA J. y GARCIA N.(1974).

LEPANGE,G.(1965):"Hyperplasies et etats precancereux du larynx".Acta O.R.L. Bel.19:1.

LEROUX-ROBERT (1939):cit. ALONSO(1961).

LEVERETT (1743):cit. ALBERTI (1985).

LEVINE,H.,RATZ,J.,BAILINPH.(1985):"Squamous cell carcinoma of the head and neck selective management according to site and stage-skin"Otolaryngologic Clinics of North America.18:499-503.

LEVINE,L.(1986):"Nonsquamous neoplasms of the larynx".The Otolaryngologic Clinics of North America.Saunders.Philadelphia.

LEWIN (1861):cit. SILVER (1985).

LINGEMAN,R.,HELMUS,G.,STEPHENS,R.,ULM,J.(1977):"Neck dissection:radical or conservative".Annals of Otology,Rhinology and Laryngology.86:737-744.

LIPKING,A.,MILLER,R.,WOODS,G.(1985):"Squamous cell carcinoma of the oral cavity,pharynx and larynx in young adults".Laryngoscope.95:790-793.

LISON,L.(1960):"Histochimie et cytochimie animales".3 ed.Gautier-Villars.Paris.

LOPEZ AGUADO,D.(1975):"Estudio histotopográfico,macroscópico,microscópico y ultraestructural del cancer laringeo".Tesis doctoral.

LOPEZ CAMPOS,J.,PEREZ CRESPO,J.(1975):"Aspectos ultraestructurales del carcinoma laringeo".IX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Otorrinolaringologia y Patologia Cervicofacial .Malaga.

MACARTNEY,J.,CAMPLEJOHN,R.,POWELL,G.(1986):"DNA fow cytometry of histological material from human gastric cancer".J.Pathol.184:273-277.

MACFARLANE BURNET (1957):cit. EKKERHARD (1986).

MACKENZIE,M.(1863):cit. MININGERODE (1986).

MALICKA,K.(1971):"Attempt at evaluation of defensive activity of lymph nodes on the basis of microscopic and clinical studies in cases of laryngeal cancer".Pol.Med.J.10:154.

MANSSON,I.,WISKE,J.,KINDBLOOM,L.(1987):"Lipoma of the hypopharynx.A case report and review of the literature".J.Laryngol.Otol.92:1037-1043.

MANUEL GARCIA (1854):cit. SILVER (1985).

MARCHEWSKY,A.,GIL,J.(1986):"Applications of computed interactive morphometry in pathology II.A model for computer generated diagnosis".Lab.Invest.54:708.

MARCHOWSKY,A.,GIL,J.,JEANTY,H.(1987):"Computed interactive morphometry in pathology.Current instrumentation and methods".Human Pathology.18:3320-331.

MC GAVRAN (1961):cit. FERLITO (1976).

MC MILLAN,R.,FECHNER,R.(1986):"Pleomorphic adenoma of the larynx".Arch.Pathol.Lab.Med.110:245-247.

MEIJER,J.,RAMAEKERS,S.,MANNI,J.,SLOOFF,J.,ALDEWEIRELDT,J., VOEYS,G.(1988):"Intermediate filament proteins in spindle cell carcinoma of the larynx and tongue".Acta Otolaryngol (Stockh).106:306-313.

MENDENHALL,W.,MILLION,R.(1986):"Elective neck irradiation for squamous cell carcinoma of the head and neck:analysis of time-dose factors and causes of failure".12:714-746.

MENDEZ,O.,MAVES,M.,PANJE,W.(1985):"Squamous cell carcinoma of the head and neck in patients under 40 years of age".Arch.Otolaryngol.111:762-764.

MERTENS,J.,GREISSER,G.,KAISERLING,E.,RUDVERT,H.(1986):"Pap illäres adenokarzinoma des stimmbands der erste fall in der literature".H.N.O..34:81-84.

MILLER (1953):cit.BAUER (1972).

MINGOT,J.,BARRES,D.,DURIGON,M.(1981):"Methodes histomorfometriques"..Ann.Pathol.1:152-155.

MININGERODE,B. (1986):"The disease of emperor Frederick III".Laringoscope.96:200-203.

MONFARDINI,S.,VOLONTERIO,A.,MARCHINI,S.(1985):"Single agents known to be in head and neck cancer".Chemiotherapia.4:303-309.

MORGAGNI (1682-1771):cit. WELSH (1983).

MORGAGNI (1732):cit. SILVER (1985).

MORI,Y.,LENNERT,K.(1969):"Electron microscopic atlas of lymph node cytology and pathology"Springer Berlag.

MORRA,B.,BEATRICE,F.,CAVALLO,G.(1984):"Evaluation of blocking machanisms against immunological responses in patients with laryngeal carcinomas.Laryngoscope.94:825-827.

MORRA,B.,CORTESINA,G.,STAFFIERI,A.,FIORELLA,R.(1987):"rela tionship betwen cervical nodal metastases and laryngeal cancer".Journal of Laryngology and otology.101:1168-1175.

MOULIN,J.,MUR,J.,WILD,P.,PERREAUX,J.PHAM,Q.(1986):"Oral cavity and laryngeal cancers among man-made mineral fiber production workwers".Scabd.J.Work Environ health.12:27-331.

MUELLER,S.,ROSEN,E.,LEVINE,E.(1980):"Cellular senescence in a cloned strain of bovine fetal aortic endothelial cells".Science.207:889.

MULLER Y FERRIN (S. XVIII):cit. GARCIA,J. y GARCIA,N.(1974).

MUSTROW,T.,ZENNER,H.(1985):"Natural killer cell activity with carcinoma of the larynx and hypopharynx".Laryngoscope.95:1391-1400.

NIELSEN,K.,BAK-PEDERSEN,O.(1984):"Goblet cells in the laryngeal mucosa in cancer of the larynx".Laryngoscope.94:1230-1234.

NIELSEN,K.,BAK-PEDERSEN,O.(1984):"Whole mount technique for demonstrating mucous elements in the mucosa of the adult human larynx".Acta Otolaryngol.(Stockh).Suppl.412:136-137.

NIELSEN,K.,BAK-PEDERSEN,O.(1985):"Globet cells in the laryngeal mucosa in benign diseases of the larynx".Ann.Otol.Rhinol.Laryngol.94:176-180.

NIELSEN,K.,BAK-PEDERSEN,O.(1985):"Goblet cells in the normal adult human larynx studies on morphology,distribution and density."Anat.Anz.Jena156:303-319.

OGURA y BELLO (1952):cit. GAVILAN (1972).

OGURA,J.,MAISEL,R.(1974):"Neurofibromatosis with laryngeal involvement".Laryngoscope.83:132-140.

OLOFSSON,J.,LUNDGREN,J.,HELLQUIST,H.,GRÖNTOFT,L.(1983):"Scanning electron microscopy of vocal cord hyperplasia,keratosis,papillomatosis,dysplasia and carcinoma".Acta Otolaryngol.(stockh).6:315-327.

OPHIR,D.,FLORENCE,N.,MARSHAK,G.(1986):"Granulomatous reaction in lymph nodes draining laryngeal carcinoma".Head and Neck Surgery.8:214-217.

ORR (1979):cit KIRCHNER (1984).

ORS LLORCA,F.(1970):"Anatomia humana".Ed.Cientifico-médica.Barcelona.

PAPAC,R.(1985):"Medical aspects of head and neck cancer".Cancer Investigation.3:435-444.

PAPARELLA,M.,SCHUMRICK,D. (1987):"Otorinolaringologia".Tomo II.Ed Panamericana Buenos Aires.

PARSONS,J.,MILLION,R.,CASSINI,N.(1985):"The influence of excisional or incisional biopsy of metastatic neck nodes on the management of head and neck cancer".J.Radiation Oncology Biol.Phys.11:1447-1454.

PATTERSON,S ,YARINGTON,C.(1987):"Carcinoid tumor of the larynx:the role of conservative therapy".Ann.Otol.Rhinol.Laryngol.96:12-14.

PELLEGRINO,M.,RUSSO,C.,FERRONE,S.(1982):"Heterogeneous distribution of determinants defined by monoclonal antibodies on HLA-A and B antigens bearing molecules".Transplantation.34:18-23.

PELLETAN (1788):cit. SILVER (1985).

PIERRI,I.,CORDONE,G.,PICCARDO,C.,DOGNA,S.,BARABINO,A.,INDI VERI,F.(1985):"T-lymphocytes phenotype and function in patients with head and neck cancer".Arch.Otolaryngol.109:332-344.

PILLER,H.(1973):"Microscope photometry".Springer Verlag.Berlin.

POPPEMA,S.,BHAM,A.,REINHERZ,E.,CLUSKEY,R.,SCHLOSSMAN,S.(19 81):"Distribution of T cell subsets in human lymph nodes".J.Exp.Med.153:30-41.

PRADES,J. (1971):"Microcirugia endolaringea".Ponencia oficial de la XVII reunión anual de la sociedad española de otorrinolaringologia.Acto Otorrinolaringológica Española.5:5-12.

PRESSMAN (1956):cit. WELSH (1983).

PUTMAN,H.,JAMASE,H.(1979):"Oncocytic papillary cystadenomatous of the larynx".Cancer.44:2306-2311.

QUARANTA,V.,WALKER,B.,PELLEGRINO,M.,FERRONE,S.(1980):"Purification of immunologically funtional subsets of human Ia-like antigens on a monoclonal antibody (Q5/13)immunosorbent".J.Immunol 125:1421-1425.

RABIN,B.(1986):"Monoclonal antibodies".Postgraduate Medicine.79:293-303.

RABIN,B.,JOHNSON,J.,CLAASEN,D.(1984):"Identification of subsets of lymphoicytes infiltrating head and neck tumor tissue:a preliminary report".Laryngoscopoe.94:688-690.

RANKEN,R.,KAPLAN,M.,SILVERMAN,S.(1987):"A monoclonal antibody to squamous cell ccarcinoma".Laryngoscope.97:657-662.

RASCH,E.,RASCH,R.(1979):"Application of microcomputer tecxhnology to cytophotochemistry.The J. of Hystochemistry and Cytochemistry.27:1384-1387.

REBAI,N.,MALISSEN,B.(1983):"Structural and genetic analysis of HALA class I molecules using monoclonal antibodies".Tissue Antigens.22:107-117.

REMACK (1852):cit. LAIN ENTRALGO (1978).

REVIER,V.,WOODRUFF,J.(1986):"Melanoma of the larynx".Laryngoscope.96:1986.

RICHARD,J.,GARNIER,S.,SARAVAGE,D.,MICHEAU,C.,CACHIN,Y.(1987):"Prognostic factors in cervical lymph node metastasis in upper respiratory and digestive tract carcinomas:study of 1.713 cases during a 15 year period".Laryngoscope.97:97-101.

RICHTSMEYER,W.,BOWERS,W.,ELLSWORTH,CH.,SORGE,K.,BERKOWITZ,M.(1984):"Dendritic cell identification in head and neck lymphoid tissue".Arch.Otolaryngol.110:701-706.

RICKER,H.,BICHLER,E.(1985):"Nutritional and immunological investigation in head and neck cancer patients before and after therapy".Arch.Otolaryngol.242:149-153.

RING,A.,SAKO,K.,RAO,V.,RAZACK,M.,REESE,P.(1985):"Immunologic patterns of regional lymph nodes in squamous cell carcinoma of the floor of the mouth".American Journal of Surgery.150:461-465.

RISCHTMEYER,W.,EISELE,D.(1986):"In vivo anergy reversal with cimetidine in patients with cancer".Arch. Otolaryngol.Heah and Neck Surg.112:1074-1077.

RISCHTSMEYER,W.,GOEPFERT,H.,REMER,D.(1987):"Anergy reversal with cimetidine in patients with head and neck cancer".Arch.Otolaryngol.Head and Neck Surg.Vol.114:701-705.

RYAN,U.,CLEMENTS,E.,HABLISTON,D.(1978):"Isolated and culture of pulmonary artery endothelial cells".Tissue Cell.10-535.

SAMUEL,J.,FERNANDES,C.(1985):"Hamartomas of the head and neck".S.Afr.Med.J.68:265-267.

SCHANTZ,S.,PIOSSON,L.(1986):"Natural killer cell response to regional lymph node metastases".Arch.Otolaryngol.Head and Neck Surg.112:545-551.

SCHARTZ,S.,ROMABALL,M.,BABCOCK,G.,NISHIOKA,K.,GOEPFERT,H.(1985):"The effect of surgery on natural killer cell activity in head and neck cancer patients".Laryngoscope.95:588-598.

SCHLEIDEN (1804-1881):cit. LAIN ENTRALGO (1978)

SCHULLER,D.(1984):"An assesment of neck node immunoreactivity head and neck cancer".Laryngoscope.Suppl.

SCHULLER,D.,KOOLEMAN-BEYNEN,A.,LIBBY,D.,RINEHART,J.,MILO,G.(1986):"Impact of metastases on nodal immunoreactivity in head and neck cancer".Laryngoscope.96:1189-1192.

SCHULLER,D.,LIBBY,D.,RINEHART,J.,MILO,G.,KOOLEMANS-BEYMEN, A.(1985):"Immunomodulation of nodal lymphocytes in head and neck cancer".Arch.Otolaryngol.111:465-468.

SCHWARTZ,S.(1978):"Selection and characterization of bovine aortic endothelial cells".In Vitro.14:966.

SCHÖLLER,D.,MCGUIRT,W.,MCGABE,B.,YOUNG,D.(1980):"The prognostic significance of metastatic cervical lymph nodes".Laryngoscope.90:557-570.

SCHÖLLER,D.,McGUIRT,W.,McCAJE,B.,YOUNG,D.(1980):"The significance of metastases in cervical lymph nodes".Laryngoscope.90:557-570.

SERAFINI,I.(1970):"Laringectomia totale con riconstruzione delle vie aerodigestive.Metodo personale".Arch.Ital. di O.R.L. 81:377.

SESSIONS,D.(1976):"Surgical pathology of cancer of the larynx and hypopharynx".Laryngoscope.86:814-832.

SESTIER (1852):cit. WELSH (1983).

SHACKNEY,S.,SKRAMSTAD,K.(1979):"A dynamic interpretation of multiparameter studies in the lymphomas".Am.J.Clin.Pathol.72:756-764.

SHI,S.,BHAN,A.,PILCH,B.,CHEN,L.,GOODMAN,M.(1984):"Keratin antibody localization in head and neck tissues and neoplasms".The Journal of Laryngology and Oyology.98:1241-1250.

SHIMOKAWARA,I.,IMAMURA,M.,YAMANAKA,N.,ISCHI,Y.,KIKUCHI,K.(1982):"Identification of lympnocite subpopulation in human breast cancer tissue and its significance:an immunoperoxidase study with anti-human T and B-cell sera".Cancer.49:1456-1464.

SIEMENS S.,ANAGNOSTAKI,T.(1984):"Agressive fibromatosis (extraabdominal desmoids) of the head and neck".British Journal of Plastic Surgery.37:453-457.

SILVER,C. (1985):"Cirugia del cancer de laringe".Ed.Toray Barcelona.

SISSONS,G.,PELZER,H.(1985):"Staging system by sites.Problems and refinements".Otolaryngologic Clinics of North America.Vol18,N.3.:397-402.

SNYDERMAN,N.,JOHNSON,J.,SCHRAM,V.,MYERS,E.,BEDETTI,C.,THEARLE,P.(1985):"Extracapsular spread of carcinoma in cervical lymph nodes".Cancer 56:1597-1599.

SOTTO,J.,CAILLOT,P.,SOTTO,M.(1982):"Non-Hodgkin's malignant lymphomas:A cytologic classification based on statistical analysis and correlated with prognosis".Anal.Quant.Cytol.4:6.

SPIRO,R.(1985):"The management of neck nodes in head and neck cancer: a surgeon's view".Bulletin of the New York Academy of Medicine.61:629-637.

STANLEY,R.,WEILAND,L.,DE SANTO,W.,NEEL,H.(1985):"Limphoepithelioma (undiferenciated carcinoma) of the laryngohypopharynx.Laryngoscope.95:1077-1081.

STEEL,G.(1974):"The growth kinetics of tumors in the relation to their therapeutic response".Laryngoscope.32:359-370.

STILLWAGON,G.,SMITH,R.,HIGSTEIN,C.,LEE,D.(1985):"Adenoid cystic carcinoma of the supraglottic larynx".Am.J.Otolaryngol.:309-314.

STORK (1880):cit. SILVER (1985).

STRAGIER,H.(1987):"Practical flow cytometry".Flow Cytomwtry.4:431-435.

STROME,M.,CLARK,J.,FRIED,M.,RODLIFF,J.,BLAZAR,B.(1987):"T cell subsets and natural killer cell function with squamous cell carcinoma of the head and neck".Arch.Otolaryngol.Head and Neck Surg.113:1090-1093.

STRONG,E.(1981):"The calssical radical neck dissection".Head and Neck Oncology.Medical Publischers.Boston.

SURJAN,L.,BAJTAI,A.(1985):"The role of scanning electron microscopy in the diagnosis of human laryngeal cancer".Acta Otolaryngol (stoch).99:236-238.

SVENNELINE,J.,SVAAR,H.(1979):"Conten and distribution of macrophages and lymphocites in solid malignant human tumors".INT.J.Cancer.24:754-758.

SWERDLOW,J.,MARL,S.,DAVEY,F.(1984):"Nonhodgkin's lymphoma limited to the larynx".Cancer.53:2546-2550.

TAYLOR,S.,SISSON,G.,BYTELL,D.,RAYNOR,W.(1983):"A randomized trial of adjuvant BCG immunotherapy in head and neck cancer".Arch.Otolaryngol.109:544-549.

TENTA,L.,KEYES,G.(19850:"Epithelium and neoplasms of epithelial origin".Otolaryngologic Clinics of North America.

THORSBY,E.,BERGHOLTZ,B.,BERLE,E.,BRAATHEN,L.,HIRSCHBERG,L.(1982):"Involvement of HLA in T-cell immune responses".Transplant.13:903-909.

TONCINI,C.,PESCE,C.(1983):"Melanin pigmentation of the larynx".Acta Otolaryngol.96:189-192.

TONCINI,C.,PESCE,C.(1985):"Granullar cell tumors of the oesophagus and larynx".The Journal of Otolaryngology and Otology.99:1301-1304.

TONCINI,C.,PESCE,C.,TOBIA-GALLENI,F.(1984):"APUD cells of the larynx"Acta Otolaryngol.(stock).98:158-162.

TROUSSEAU y BELLOC (1837):cit. SILVER (1985).

TSAKRAKLIDES,V.,RERSEY,J.,ANASTASSIADES,O.(1973):"Prognostic significance of regional lymph node histology in uterine cervical cancer".Cancer.31:860.

TUBBS,R.(1986):"Nonsquamous tumors of the head and neck I".The Otolaryngologic Clinics of North America.Saunders.Philadelphia.

TUCKER (1961):cit. WELSH (1983).

TUCKER (1976):cit. SILVER (1985).

TUCKER,G.(1963):"Some clinical inferences from study of serial laryngeal sections".Laryngoscope 73:728-748.

TUCKER,G.(1971):"Human larynx coronal sections atlas".Armed Forces Institute of pathology.Washington.

TUCKER,G.(1973):"A histological method for the study of the spread of carcinomas within the larynx".Trans.AM.Laryngol.Assoc.82:40-53.

TURK (1855):cit. SILVER (1985).

VAN DER VALK,P.,MOSCH,A.,KURVER,P.,MEISER,C.(1979):"Morphometric characterisation of 52 B cell non Hodgkin's lymphomas".J.Clin.Pathol.36:289.

VAN DUINEN,S.,ROITTER,P.,FERRONE,S.(1986):"Associated expresion of HLA class I and class II antigens on melanoma cells in surgically removed metastases".Journal of Pathology 149:339-348.

VAUGHAN,CH.(1985):"Work-up and treatment planing for head and neck cancer".Otolaryngologic Clinics of North America.18:403-409.

VOLMER,J.(1985):"Malignes fibröses histiozytom des larynx".Laryng.Rhinol.Otol.64:579-581.

WALTER,R.DANIELSON,J.(1985):"Defective monocyte chemotaxis in patients with epidermoid tumours of the head and neck".Arch.Otolaryngol.111:538-540.

WATSON (1866):cit. SILVER(1985).

WATWRMAN (1958):cit. BERLINGER (1976).

WEILAND (1985):cit BAUER (1972).

WEISS,H.(1961):"Unterschiedliche formen der wucherngsvergange am aphitel des kehlkopfes itre gegenseitige abgrenzung und therapeutische schlusfolgerungen.Z.Laryng.Rhinol.40:597-611.

WELSH,L.,WELSH,J.,RIZZO,T.(1983):"Laryngeal spaces and lymphatics.Currents anatomic concepts".Ann.Otol.Rhinol.Laryngol.72:19-31.

WILLEN,R.,NATHANSON,A.,MOBERGER,G.,ENNEROTH,G.(1975):"Squamous cell carcinoma of the gingiva.Histological clasification and grading of malignancy" Acta Otolaryngol(Stockh.).79:146.

WIND,J.(1970):"On the phylogeny and the ontogeny of the human larynx".Wolters-Nourdhoff publishing.Groningen.

WIRCHOW,R. (1821-1902):cit. LAIN ENTRALGO (1978)

WOLF (1732-1803):cit. LAIN ENTRALGO (1978).

WOLF,G.,CAREY,T.,VELTRI,R.(1986):"Cell biology and immunology in head and neck squamous cell carcinoma".Ann.Otol.Rhinol.Laryngol.94:342-345.

WOLF,G.,LOVET,E.,PETERSON,K.,BEAUCHAMP,M.,BACKER,S.(1984):"Lymphokine producction and lymphocyte subpapulations in patients with head and neck squamous carcinoma".Arch.Otolaryngol.110:731-735.

WOLF,G.,PETERSON,K.,LOVETT,E.(1985):"In situ immune modulation by thymosin alpha1 in patients with head and neck carcinoma"Head and Neck Surgery.7:350-356.

ZAJICECK,J.,BARTELS,P.,BAHR,G.,BIBBO,M.,WIED,G.(1972):"Computer analysis of lymphocites from cases with lymphadenitis and lymphocytic lymphoma".Acta Cytol.16:284-292

ZBAAREN,P.,LEHMAN,W.(1987):"Frecuency and sites of distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma".Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg.113:762-763.

ZENNER,H.(1986):"Selective killing of laryngeal carcinoma cells by monoclonal immunotoxin".Ann.Otol.Rhinol.Laryngol.95:115-120.

ZENNER,H.HERRMAN,I.,MOSER,L.(1986):"Der monoklonale antikörper uw 21/123:klinische anwendung und diagnostische spezifität bei kopt-und halskarzinomen".Laryngol.Rhinol.Otol.65:267-291.

ZEROMSKI,J.,SZMEJA,Z.,REWERS,A.,KIRUK-ZAGAJEWKA,A.(1986):" Immunofluorescent assesmente of tumour infiltrating cells in laryngeal carcinoma".Acta Otolaryngol.(Stoch).102:325-332.

ZIMMER,H.(1973):"Microphotometry".En :Micromethods in molecular biology".Springer Verlag.Berlin.